

**Résumés des projets autorisés utilisant des animaux à des fins scientifiques
Deuxième semestre 2020 (du 1^{er} juillet 2020 au 31 décembre 2020)**

16014 L'incidence des maladies rénales chroniques (MRC) est en progression constante et représente actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Ainsi en France les maladies rénales d'origine 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 est plus ou moins lente mais 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.

Parmi les acteurs associés à la progression de la maladie rénale, le récepteur nucléaire Farnesoid X receptor a été identifié comme une molécule pouvant protéger de cette atteinte.

En effet il a été montré que chez le patient transplanté, une diminution de FXR précède et permet de prédire l'apparition de la MRC et que chez la souris, elle ralentit l'évolution de la MRC.

Ce projet vise à évaluer l'efficacité de trois molécules agonistes de FXR dans deux modèles de pathologie rénale chez la souris reflétant la variabilité de la maladie rénale humaine : l'ablation de tissu rénal et l'obstruction d'un uretère. Les souris seront gavées soit avec une des trois molécules agonistes de FXR soit avec un placebo pour une durée de 14 ou 21 jours selon le modèle. Un premier prélèvement de sang sous anesthésie gazeuse et locale avant le début du traitement et un deuxième sous anesthésie générale à l'échéance de l'étude seront réalisés afin d'estimer la fonction rénale. L'urine, les reins et les foies seront prélevés en post-mortem pour analyses.

Ce projet sur 3 ans utilisera 117 souris. Toutefois ce programme de recherche est développé afin de respecter les règles éthiques des 3R:

1) Remplacement : La complexité du rein et de la maladie rénale nécessite l'utilisation d'un modèle animal. Mais les molécules agonistes ont préalablement été testées sur des cultures cellulaires ce qui nous permet d'envisager une gamme d'efficacité sans toxicité pour les animaux.

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 : les deux modèles de MRC utilisés entraînent une altération progressive du tissu rénal. Comme chez l'homme, ces maladies restent longtemps silencieuses et les animaux seront mis à mort avant l'apparition de symptômes douloureux.

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 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 prises de sang seront réalisées soit sous anesthésie gazeuse et locale en cours d'étude soit sous anesthésie générale à l'échéance pour éviter la souffrance et l'angoisse des animaux. Ils bénéficieront d'un programme d'enrichissement, comme des carrés de cellulose, des bâtonnets de bois ou une maisonnette, défini par la cellule de l'établissement chargée de leur bien-être.

Cette étude vise à ralentir la progression de la maladie rénale chronique dans deux modèles murins. Elle représente un enjeu thérapeutique important quant au traitement de l'insuffisance rénale chronique chez l'homme.

16015 Les autoanticorps anti-récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) et plus précisément ceux qui sont dirigés contre la sous-unité GluN1, ont été mis évidence dans plusieurs désordres du système nerveux central (SNC) comme par exemple dans les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou dans la sclérose en plaques (SEP).

Mais leur rôle a été mieux décrit dans l'encéphalite à autoanticorps anti-NMDAR (EA) et la schizophrénie.

L'EA est une maladie auto-immune du SNC. Elle se caractérise par une inflammation qui va conduire à différents symptômes neurologiques et psychiatriques. Cette maladie est mortelle si aucun traitement n'est administré aux patients.

L'auto-immunité est un désordre qui se met en place lorsque le système immunitaire (SI) n'arrive plus à discriminer ce qui est pathogène de ce qui est sain. Le SI va s'attaquer aux composants de l'organisme et ainsi induire des pathologies comme l'EA ou de manière plus connue la SEP.

L'EA a été décrite pour la première fois en 2007. Bien qu'il soit difficile d'appréhender toute la complexité de cette maladie, certains mécanismes pathologiques intervenant au niveau des neurones sont connus. Les autoanticorps interagissent avec les NMDAR post-synaptiques et provoquent leur internalisation réduisant alors drastiquement leur présence post-synaptique. Ils peuvent aussi induire la redistribution des NMDAR au niveau des dendrites, les rendant moins accessibles.

À l'inverse, les processus immunologiques qui sont à l'origine de la production de ces autoanticorps restent mal compris.

Il est admis que la production d'anticorps par les lymphocytes B (LB) nécessite l'aide des lymphocytes T (LT). Ces deux populations de lymphocytes coopèrent et ne reconnaissent pas la même partie d'un antigène (épitope). À ce jour, aucune donnée n'existe sur le rôle des LT dans l'EA. C'est pourquoi notre projet est d'identifier des épitopes T de GluN1 des NMDAR chez la souris via une immunisation active. Nous avons sélectionné des peptides de GluN1 prédits les plus immunogènes à l'aide de logiciels de bio-informatique, que nous validerons *in vivo* et *ex vivo* afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques. La connaissance des épitopes T impliqués pourra rendre possible la mise au point de stratégies d'immunothérapies immunomodulatrices.

Le mode d'immunisation des souris se fera de la même manière que l'induction de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) dans un modèle murin de SEP connu pour induire une réponse des LT. Notre laboratoire a également développé un modèle murin d'EA médié par les LB avec cette méthode d'immunisation. Dans un premier temps, la caractérisation des cellules immunitaires se fera à l'aide d'anticorps spécifiques de marqueurs présents sur ces cellules et seront analysées en cytométrie en flux. Les autoanticorps anti-NMDAR seront mis en évidence par une technique de dot blot complémentaire à des techniques d'immunofluorescence (IF) et d'immuno-histochimie (IHC). La réponse des LT aux peptides antigéniques de GluN1 des NMDAR sera mesurée par ELISpot. Enfin, comme l'immunisation des animaux se fera avec des antigènes du SNC, les réponses immunitaires pourront engendrer des modifications comportementales. C'est pourquoi des tests comportementaux seront effectués, afin d'évaluer une potentielle réaction des animaux à cette immunisation.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques. Elle répond à la règle des 3 R (Remplacer, Réduire, Raffiner) comme décrit ci-dessous :

Premièrement, 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 pour caractériser les épitopes T GluN1 d'intérêt après immunisation des souris. Que ce soit pour les effets de l'immunisation ou l'étude de la réponse immunitaire, il est important de pouvoir tester ces paramètres chez l'animal afin d'étudier les réponses d'un organisme complexe. De plus, cette étude utilisant des animaux se base sur une bibliographie pertinente rendant cette étude sérieuse et fondée sur des principes scientifiques déjà établis. Afin de Réduire le nombre d'animaux inclus dans notre étude, nous procéderons à une limitation aux seules expériences considérées comme absolument indispensables. Nous avons défini, en amont, la taille des groupes de nos animaux grâce à l'emploi d'une analyse de puissance statistique. 250 animaux seront nécessaires pour mettre en évidence des phénomènes biologiques reproductibles et robustes sur lesquels des analyses statistiques pourront être réalisées. Enfin, afin de souscrire au principe de Raffinement, les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement sont optimisées

(cages standards aux normes européennes avec litière enrichie et favorisation de la nidification). 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 ». Le protocole est planifié pour éviter le stress des animaux. Nous avons établi en amont des points limites (ou critères d'arrêt anticipé) de la procédure. Le Raffinement concernant les méthodes et les procédures expérimentales sera assuré par des soins adéquats avant, pendant et après chaque procédure expérimentale, ainsi que 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 procédures de mise à mort appropriées.

Mots clés : encéphalite auto-immune ; autoanticorps anti-NMDAR ; cellules immunitaires ; épitopes T GluN1.

16016 Les cancers des voies aéro-digestives supérieures représentent le cinquième cancer le plus fréquent en France. Malgré les associations de différentes thérapies (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapies) des récurrences loco-régionales ou à distance sont fréquemment observées conduisant à une survie inférieure à 35% à 5 ans. De nouvelles associations thérapeutiques sont donc à tester en vue d'améliorer ce pronostic. L'objectif de l'étude est d'une part d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'association de l'immunothérapie à diverses modalités de radiothérapie (photons, protons, ions carbone) dans un modèle de cancer ORL métastatique et d'autre part d'appréhender les mécanismes moléculaires de la réponse immunitaire mis en jeu. En effet, la synergie entre la radiothérapie aux ions lourds (proton ou carbone) et l'immunothérapie pourrait être supérieure à celle avec les photons. Cette étude, dont uniquement la procédure avec la radiothérapie photonique sera réalisée ici, constitue un pré requis incontournable à une étude clinique de phase 1 chez l'homme. De ce fait, l'utilisation d'un modèle *in vivo* est indispensable pour se rapprocher au plus près de la pathologie humaine. Le modèle murin nous permettra d'évaluer l'efficacité et la tolérance du traitement. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle informatique, ni de modèle *in vitro*, pouvant « remplacer » ce modèle animal. En outre, ce travail permettra de définir l'intérêt d'associer l'immunothérapie aux radiothérapies innovantes par protons ou ions carbone par rapport à la radiothérapie conventionnelle par photons.

Compte-tenu des objectifs et en application du principe des 3R, un modèle de souris immunocompétentes, greffées avec des cellules tumorales de souris apparaît comme pertinent. Concernant la « réduction », le nombre d'animaux a été calculé à minima par rapport à l'effectif nécessaire pour une exploitation statistique des résultats et a donc été fixé à 108 souris. Les souris seront traitées selon le schéma thérapeutique similaire à l'homme avec une immunothérapie encadrant une radiothérapie photonique séquentielle sur une semaine. Les souris seront ensuite randomisées en deux groupes d'analyses, les souris prévues pour l'analyse précoce sur la tumeur mises à mort à la fin de la séquence thérapeutique et les souris prévues pour l'analyse d'efficacité et de tolérances qui seront suivies pour une durée maximum de 12 semaines. L'effet vaccinal des thérapies sera évalué sur les souris en rémission clinique par une seconde injection de cellules tumorale.

Les radiothérapies locales seront contrôlées, réalisées sous anesthésie et n'excéderont pas 1 minute, 1h de surveillance est prévue suite aux différents traitements. Le suivi des animaux sera quotidien lors des traitements puis trois fois par semaine lors de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique et comprend la pesée, l'évaluation de leur état général et les points limites. Concernant le « raffinement », la présence de signes de souffrance conduira à l'administration d'antalgiques, voire à l'arrêt de l'expérimentation et à la mise à mort de la souris si ces signaux persistent.

16017 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 différentes modalités d'activité physique (AP) sur la cachexie cancéreuse. Pour se faire, nous aurons quatre groupes d'animaux. Un groupe de souris saines (n=42), un groupe de souris cancer (n=42), un groupe de souris cancer qui réalise un entraînement sur tapis roulant (n=42) et un groupe de souris cancer qui réalise de l'activité physique spontanée sur roue d'activité (n=42).

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, 168 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).

16018 Dans la nature, l'olfaction joue un rôle prépondérant dans l'expression de différents comportements sociaux et reproducteurs. Chez la souris, les informations olfactives émises dans les urines et autres sécrétions corporelles sont utilisées pour s'identifier et ainsi induire une réponse comportementale adaptée lors de la rencontre entre deux congénères. Nombre de ces comportements sont dépendants d'un organe spécialisé dans la détection de ces odeurs: l'organe voméronasal.

Nous avons mis en évidence l'implication d'une population de neurones voméronasaux dans le contrôle de plusieurs comportements à médiation olfactive, tel que le comportement d'agression. De plus, nous avons mis en évidence plusieurs régions cérébrales responsables du traitement de l'information olfactive perçue par ces neurones voméronasaux. Cependant, les mécanismes d'interprétation des signaux olfactifs restent encore méconnus. Pour les comprendre, il est essentiel d'enregistrer l'activité d'un grand nombre de neurones. L'imagerie cérébrale sur animal vigile nous permet de réaliser cet objectif et d'ainsi identifier les structures neuronales impliquées dans la mise en place des comportements sociaux médié par le système olfactif.

Nous effectuerons une imagerie directe des neurones et comparerons leur activité lors de différents types de paradigmes de comportement social à médiation olfactive: l'attraction/aversion olfactive, l'agression, la dominance sociale, le comportement sexuel et le comportement parental. Ces analyses seront réalisées sur des animaux chez lesquels les neurones voméronasaux d'intérêt sont non fonctionnels, ainsi que sur des animaux contrôles.

Ceci permettra d'une part de mettre en évidence les différents circuits cérébraux contrôlant les différents comportements sociaux, et d'autre part de déterminer l'implication de la signalisation voméronasale de nos neurones d'intérêt sur ces circuits cérébraux.

Ce projet utilisera 402 souris mâles et femelles.

Sur le plan des 3 R, les précautions suivantes seront prises :

-remplacement : aucune méthode ne permet à l'heure actuelle de remplacer l'étude d'une réponse physiologique ou comportementales intégrée comme celles qui sont proposées ici par des méthodes substitutives *in vitro* ou de modélisation.

-réduction : le nombre d'animaux a été réduit au maximum compte tenu des techniques utilisées et pour maintenir la possibilité d'une bonne mise en évidence d'une différence statistique.

-raffinement : les animaux seront hébergés en groupes sociaux sur litière et avec un enrichissement (abri cartonné et matériel de nidification) afin de réduire le stress. Des protocoles d'administration d'analgésiques sont prévus en cas de souffrance de l'animal.

16019 La maladie cœliaque (MC) est une maladie intestinale inflammatoire fréquente induite chez des sujets génétiquement prédisposés par l'ingestion du gluten contenu dans les céréales (blé, seigle, orge). 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 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. Ceux-ci se développent à partir des lymphocytes intraépithéliaux (LIE) siégeant dans l'épithélium intestinal et, plus précisément, à partir d'une sous population particulière des cellules lymphoïdes. Chez certains patients cœliaques, ces cellules peuvent donner naissance à un lymphome intraépithélial de bas grade aussi appelé maladie cœliaque réfractaire de type II (MCR II). Les LIE formant le lymphome intraépithélial contiennent des mutations d'une voie de signalisations spécifique favorisant la croissance et la survie cellulaire.

Notre hypothèse est que les mutations confèrent un avantage sélectif aux cellules mutées par rapport aux cellules normales au sein de l'intestin des patients cœliaques. Ces cellules mutées pourraient être à l'origine du développement d'un lymphome intraépithélial. Celui-ci évolue initialement à bas bruit et peut évoluer vers un lymphome plus agressif de très mauvais pronostic. Les seuls traitements à l'heure actuelle, outre le régime strict sans gluten à vie, sont les corticoïdes et la greffe de cellules souches autologues (autogreffe). Toutefois, certains patients développent une résistance aux corticoïdes et tous ne sont pas éligibles à la greffe de cellules souches autologues.

Notre projet a pour but de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la MCR II dans un modèle de souris xéno greffées avec des cellules malignes de patients MCR II. Les cellules de patients étant fragiles et difficiles à manipuler *in vitro*, nous souhaitons, dans un premier temps, les amplifier via un modèle murin de xéno greffe en injectant des cellules malades de patients dans des souris immunodéficientes. Puis, dans un second temps, des traitements médicamenteux seront administrés aux souris xéno greffes.

Dans un premier temps, une étude pilote permettra de définir le nombre optimal de cellules à injecter aux souris. Les souris seront greffées par injection par voie intraveineuse dans la veine caudale sous anesthésie générale. Les prélèvements de sang rétro-orbitaux permettant de vérifier le chimérisme par cytométrie seront réalisés également sous anesthésie.

Les molécules utilisées pour le traitement sont déjà utilisées dans d'autres pathologies ou vont être en essais clinique de phase 3. Ces différents médicaments ont fait préalablement l'objet de tests *in vitro* sur ces mêmes lignées LIE de patients dont les résultats ont été très encourageants. Les plus efficaces seront sélectionnés ce qui permettra de réduire fortement l'utilisation d'animaux. Cependant l'utilisation de modèles animaux reste indispensable pour tester le mécanisme d'initiation du lymphome.

Le nombre d'animaux est évalué à 1850 souris sur 5 ans. Pour réduire leur nombre nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Nous quantifierons aussi la viabilité cellulaire avant toute injection afin d'optimiser et d'augmenter les chances de réussite de la prise du greffe.

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 animaux seront particulièrement surveillés lors de ces procédures. 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 d'un tunnel.

Un objectif thérapeutique important est la mise au point de traitements capables d'éliminer les cellules clonales mutées avant leur transformation en lymphome agressif et de très mauvais pronostic. Ce projet devrait permettre de mieux comprendre comment cibler spécifiquement ces cellules tumorales et ainsi, permettre une meilleure prise en charge des patients.

16020 Avec le vieillissement progressif de la population, le nombre de patients atteints de maladies neurodégénératives a considérablement augmenté ces dernières années. Ces maladies évoluent inexorablement vers une dégradation se traduisant par un handicap, une perte d'autonomie puis au décès des patients directement lié à l'évolution de la maladie ou à ses complications. Les tauopathies regroupent une vingtaine de maladies neurodégénératives liées à l'agrégation pathologique de la

protéine Tau se manifestant par des signes cliniques hétérogènes d'ordre psychiatrique et/ou comportemental. S'il n'existe aucun traitement à ce jour, les immunothérapies ont prouvé leur efficacité chez l'animal et représentent un réel espoir pour ralentir le développement de ces maladies chez l'homme. Cependant, la faible pénétration dans le cerveau de ces molécules constitue la principale limitation à leur efficacité chez le patient. Afin de surmonter cette limite, nous développons des méthodes de vectorisation pour augmenter la pénétration cérébrale de ces molécules. Ainsi, en les couplant à un système de transport spécifique au niveau de la barrière hémato-encéphalique, nous avons réussi à améliorer leur pénétration dans le cerveau.

L'objectif de ce projet est de mettre en œuvre un modèle transgénique murin de tauopathies permettant de tester l'effet de molécules biothérapeutiques humaines qui seront ensuite évaluées dans des essais cliniques. Ce modèle est obtenu par croisement de deux lignées de souris transgéniques, l'une avec un phénotype neurodégénératif, cognitif et moteur fin et l'autre pour faciliter le transport spécifique des biothérapeutiques humains au niveau du cerveau. Ces deux modèles sont déjà bien caractérisés et ne présentent pas de phénotype dommageable. Pour caractériser cette lignée, nous ferons des tests comportementaux à différents âges et des mesures de paramètres biochimiques et histologiques chez le même animal. Un traitement immunomodulateur sera administré à deux jours d'intervalle permettant d'évaluer des agents biothérapeutiques d'origine humaine.

Aujourd'hui, il n'y a pas d'alternative à l'expérimentation animale car la modélisation *in vitro* ne permet pas de rendre compte de la complexité de ces pathologies, cependant, elle permet dans un premier temps de valider des cibles mécanistiques et de préselectionner les meilleurs candidats médicaments. Pour être au plus proche des pathologies humaines, il faut évaluer la complexité et l'interaction de l'intégralité des systèmes biologiques, les barrières physiologiques, et les voies métaboliques, ce qui ne peut se faire que chez l'animal entier. La souris a été choisie car elle est largement utilisée dans les modèles de tauopathies.

Un biostatisticien pourra être consulté pour optimiser le nombre d'animaux et le design à utiliser en fonction de l'objectif et des contraintes de l'étude (nombre de groupes, type de comparaisons, présence de répétitions), de la variabilité des paramètres mesurés, de la taille des effets à mettre en évidence et de l'historique des données.

Nous sommes également très attentifs au bien-être des animaux, par l'amélioration des conditions d'hébergement et l'enrichissement adapté aux besoins des souris, ainsi que la conception et mise en œuvre des études par des personnels experts scientifiques de ces modèles animaux, et en lien constant avec les personnels de soins aux animaux, et les vétérinaires de l'établissement. Les phénomènes de neurodégénérescence centrale ne produisent pas par eux-mêmes de phénomènes douloureux, et les modèles de tauopathies n'engendrent pas de dégradation générale de l'animal. Des points limites généraux et spécifiques sont identifiés permettant de prendre les mesures nécessaires dans l'intérêt de l'animal dès l'apparition des signes modérés.

Le nombre maximal d'animaux utilisé dans le cadre de ces modèles est estimé à 200 souris pour la durée du projet.

16021 La thérapie photodynamique (PDT) est un traitement qui utilise un agent photosensibilisant (PS) et un type particulier de lumière. Lorsque le PS est exposé à une lumière spécifique, il y a production de certains composés qui tuent les cellules cancéreuses. La PDT est en plein essor du fait des faibles effets secondaires comparés à la chimiothérapie et des essais cliniques sont en cours pour évaluer son utilisation pour le glioblastome, le cancer de la prostate, du col utérin, de la cavité péritonéale ou de la plèvre. Notre projet consiste à bloquer l'expression d'un gène par thérapie génique ce qui rendra les cellules cancéreuses sensibles à la lumière. Nous étudierons 2 modèles tumoraux : le glioblastome et le cancer de la prostate chez la souris. L'effet de la thérapie et donc la viabilité des cellules cancéreuses éclairées se fera grâce à un gène rapporteur d'imagerie.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 72 souris sur 5 ans.

REPLACEMENT : nous souhaitons montrer l'intérêt de notre technologie dans le traitement des tumeurs. Le modèle tumoral chez l'animal, faisant appel à la physiologie est impossible à réaliser sans utiliser d'animaux.

REDUCTION : nous utilisons l'imagerie optique, grâce à un gène rapporteur, pour suivre la viabilité cellulaire suite à la thérapie par la lumière. Cette technique est non invasive et nous permet de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal.

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. La cage contient litière, nourriture, eau et est transportée dans un sac à l'abri des regards extérieurs. Le trajet dure quelques minutes. Les souris sont hébergées en groupes 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 et en cas de signes de souffrance un analgésique sera administré. Si la souffrance persiste, l'expérience sera stoppée.

16022 Le vieillissement est un processus physiologique qui touche de plus en plus de personnes dans nos sociétés actuelles modernes, et l'accumulation des maladies dégénératives liées à l'âge comme le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives, ou encore la fonte musculaire, pose de nombreux problèmes aussi bien économiques qu'humains.

Le vieillissement est causé entre autres par l'accumulation de cellules présentant un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Les mécanismes cellulaires associés au vieillissement sont induits par de nombreux stress, qui augmentent avec le temps. La caractérisation de ces stress ainsi que de la régulation de ces mécanismes cellulaires est donc déterminante pour comprendre le vieillissement et les altérations associées. Des données préliminaires ont mis en évidence *in vitro* un nouvel inducteur dans une voie métabolique. Cette voie métabolique semble être altérée au cours du vieillissement et pourrait s'avérer être un régulateur clé dans les mécanismes associés au vieillissement, hypothèse qu'il nous faut maintenant confirmer *in vivo*.

L'objectif de ce projet est donc d'induire l'activation de cette voie métabolique et ceci dans un organe (1) connu pour synthétiser du cholestérol au niveau physiologique, (2) étudié dans un contexte de sénescence et (3) associé à des altérations métaboliques au cours du vieillissement. Remplissant ces trois critères, le foie apparaît comme un organe cible d'intérêt pour étudier le rôle de cette voie métabolique dans la régulation de la sénescence et de ses effets pro-vieillissants. L'activation de cette voie métabolique se fera sur un modèle similaire à celui ayant conduit aux premiers résultats *in vitro* : l'utilisation d'un vecteur viral pour exprimer constitutivement une enzyme de la voie : la PhosphoMéValonate Kinase (PMVK). Dans un contexte *in vivo*, la surexpression se fera via un vecteur viral de type adénovirus non répliquatif. Afin d'évaluer l'impact de cette surexpression sur les fonctions hépatiques, des relevés biologiques impliquant des tests de résistance métaboliques, mais également des relevés histologiques à la fin de l'expérience pour valider l'expression de marqueurs de sénescence et analyser certaines altérations hépatiques liés à l'âge, comme la fibrose ou la stéatose. Afin de montrer fonctionnellement l'importance de la sénescence dans ce processus, un groupe supplémentaire traité avec une drogue éliminant spécifiquement les cellules sénescents, l'ABT-263 ou Navitoclax, sera utilisé.

Cette étude comportera donc une seule procédure expérimentale et utilisera un total maximum de 80 souris. Ce chiffre estimé à minima permettra de satisfaire les analyses statistiques et de réaliser l'ensemble des analyses. Conformément à la règle des 3R : Remplacer : Notre projet ayant pour but d'étudier l'impact de la sénescence sur le métabolisme hépatique, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. Raffiner : la surveillance des souris et des mesures de glycémie s'effectuera tous les 2 jours afin d'identifier et de limiter au maximum tout risque de souffrance ou de mal-être. Lors des expériences, les souris seront anesthésiées afin de limiter le stress des animaux. Réduire : Chaque souris sera suivie individuellement grâce à des tests métaboliques individuels afin de collecter le plus de données biologiques, et limiter ainsi la quantité de souris au nombre minimum pour assurer des analyses statistiques.

16023 L'organisme héberge de très nombreuses espèces de micro-organismes, ou microbiote, notamment au niveau de l'intestin. Le microbiote intestinal joue un rôle primordial sur la maturation et la réponse du système immunitaire et la santé humaine. La souris et le rat sont utilisés comme modèle d'étude du

microbiote chez l'Homme. Ce projet étudie la reconstitution de la flore intestinale de rats ou de souris dépourvues de microorganismes, par des bactéries issues de l'homme ou de la souris, ainsi que l'administration de probiotiques et leur influence sur les troubles intestinaux. Ce projet s'inscrit dans l'amélioration de la santé de patients atteints de pathologies avec un déséquilibre de la flore intestinale. Les rats sont utilisés plutôt pour investigations pharmacologiques et les souris pour des études mécanistiques.

Le projet se déroule en 2 parties:

La première partie comprend deux procédures : Cela permettra d'étudier le rôle de la barrière intestinale avec la production de peptides antimicrobiens et l'influence du microbiote dans la résolution de troubles intestinaux.

1. Colonisation par des probiotiques de souris SPF contrôles de type sauvage C57BL6, ou de souris transgéniques déficientes pour les gènes de l'immunité d'intérêt ne présentant pas de phénotype dommageable. Dans un premier temps, les animaux seront colonisés par des probiotiques pour étudier la production d'antimicrobiens intestinaux et la fonction de la barrière intestinale. Soit 550 souris au total.

2. Transfert de microbiote : les souris C57BL6 axéniques (dépourvues de microorganismes) ou SPF seront colonisées par la flore microbienne de souris saines déficientes pour certains gènes pour évaluer l'influence ou le déséquilibre du microbiote sur la barrière épithéliale intestinale et le système immunitaire. Inversement, des souris délétées pour un gène d'intérêt recevront le microbiote de souris contrôle C57BL6 ou d'autres souris délétées pour apprécier la contribution de la flore intestinale dans le phénotype de ces souris. Soit 1200 souris au total.

La première partie du projet permettra l'identification de souches probiotiques et l'étude de l'influence du microbiote dans la réponse anti-microbienne par l'intermédiaire de voies immunitaires d'intérêt telles que BAFF, IL-17 et IL-22, des inflammasomes NLRP3 et NLRP6, ainsi que la réponse de la barrière intestinale aux acides nucléiques microbiens par l'activation des voies de reconnaissance des acides nucléiques de l'hôte. Après colonisation et caractérisation, une partie de ces animaux seront réutilisés dans d'autres protocoles d'étude des réponses inflammatoires.

La deuxième partie concerne le transfert de microbiote humain et de probiotiques:

3. Colonisation de rats de type sauvage F344 ou de souris C57BL6 axéniques par une flore fécale humaine, ne présentant pas de phénotype dommageable. Différents éléments seront testés: le type de probiotique et le type de matrice (produit laitier fermenté) contenant les probiotiques, ou le type de microbiote. Ces éléments permettront de déterminer le rôle de la barrière intestinale vis-à-vis des probiotiques ou de la flore intestinale testés.

Les probiotiques et la flore microbienne sont administrés aux rats ou aux souris par voie orale. La colonisation et le microbiote seront analysés ainsi que la barrière intestinale et la réponse du système immunitaire intestinal.

Soit au total 600 rats et 600 souris pour la partie 2.

Et au total pour l'ensemble du projet: 2950 animaux: 600 rats et 2350 souris

L'objectif du projet est d'étudier les relations complexes entre le microbiote intestinal, le système immunitaire et les cellules structurales intestinales. Cette étude *in vivo* est indispensable pour ce projet puisqu'il nécessite plusieurs niveaux de complexité microorganisme/cellules/tissus qui ne peuvent être développés *in vitro* ou *in silico*. De plus la 2ème partie du projet permettra de confirmer des résultats de compétition au niveau des microorganismes obtenus *in vitro* entre probiotique et flore microbienne humaine.

Par rapport au précédent projet « Colonisation de souris et de rats par des souches bactériennes probiotiques » ce nouveau projet élargit l'étude à de nouveaux aspects de la réponse immunitaire comme la réponse aux acides nucléiques qui pourrait être influencée par le microbiote.

On n'attend pas de dommages de ces procédures sur les animaux par le transfert de microbiote d'individus sains.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation au niveau de la barrière intestinale qui nécessitent

plusieurs niveaux d'interactions entre système immunitaire et les différents organes, 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 de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

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, tel que modification de l'aspect, posture ou mobilité altérés, prise alimentaire réduite avec perte poids, sang dans les selles, ils seront mis à mort s'ils atteignent le point limite d'un score cumulé de 3 ou de 2 pour un critère, notamment perte de poids > 20.

Réduction : Vu la variabilité biologique des expériences de transfert de microbiote, des groupes de 10 animaux seront utilisés de façon à limiter le nombre de répétitions de chaque procédure expérimentale tout en ayant un nombre suffisant d'individus pour valider statistiquement les résultats obtenus.

16024 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrants du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour. Des mutations originales de l'histone H3, quasi-constantes dans les DIPG et jamais décrites dans aucun autre type de cancer, ont été découvertes. Il s'agit donc d'un mécanisme oncogénique complètement inédit et intimement lié au développement de cette partie du cerveau. Par ailleurs, les DIPG ne forment jamais de masse tumorale, mais infiltrent les structures cérébrales normales puis se disséminent dans la totalité du cerveau. Ces propriétés d'invasion, caractéristiques des DIPG, et une cause fréquente de rechute après une radiothérapie initiale limitée au tronc cérébral, reposent sur d'importantes interactions entre la tumeur et son microenvironnement qui peuvent être étudiés exclusivement dans des modèles *in vivo*.

La compréhension des processus pathogéniques particuliers de ces tumeurs demeure un challenge afin d'identifier des cibles appropriées pour de futurs développements thérapeutiques. La biologie de ces tumeurs n'a que peu été étudiée jusqu'à ces dernières années par manque de tissu tumoral disponible puisque ces tumeurs n'étaient pas biopsiées et rarement autopsiées. Les mécanismes d'invasion des cellules tumorales dans le cerveau restent toujours inconnus. Afin d'étudier ces propriétés, nous utiliserons des tranches de cerveaux de souris *ex vivo* dans lesquelles seront implantées des cellules tumorales, marquées par une protéine fluorescente. L'invasion tumorale sera suivie par microscopie optique. Ce modèle *ex vivo* nous permettra d'augmenter le nombre de réplicas expérimentaux sans augmenter le nombre d'animaux utilisés puisqu'un animal permettra de réaliser une dizaine de coupes fines de 300 microns.

Afin d'étudier un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale pour les différents sous-types tumoraux et d'obtenir des statistiques solides dans ces expériences, nous utiliserons la totalité de nos lignées cellulaires tumorigènes et dont les études préliminaires *in vitro* ont prouvés l'aptitude des cellules à envahir une matrice extracellulaire synthétique (type matrigel). Les processus d'étude de l'interaction entre le microenvironnement et les cellules tumorales ne peuvent être étudiés que sur un modèle vivant. Durant toute la période d'acclimatation, l'animal sera observé quotidiennement et stabulé avec des congénères avec un enrichissement de la cage. La procédure chirurgicale classée sans réveil sera réalisée sous anesthésie profonde. Au total, nous utiliserons au maximum 51 souris pour ce projet.

16025 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 un collyre "ocry gel" et elles 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.

16026 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.

Notre projet a pour but d'étudier, chez la souris, l'implication des cellules T invariantes associées aux muqueuses (MAIT) dans la réparation du cœur après un infarctus du myocarde. Ces modèles murins sont une étape indispensable dans la compréhension des mécanismes survenant au cours de l'infarctus du myocarde. En effet, ces événements sont des phénomènes complexes, que des modèles *in vitro* ne pourraient pas permettre de recréer. Ces modèles murins nous permettront notamment d'appréhender les multiples interactions entre différentes cellules, mais également entre différents organes, qui sont mises en jeu au cours des phénomènes de réparation tissulaire consécutifs à une atteinte cardiaque.

Ce projet comporte 3 procédures qui impliqueront 480 souris au total sur une durée de 5 ans. Des souris génétiquement modifiées nous permettront d'analyser spécifiquement le rôle de ces cellules. Ces animaux subiront un infarctus du myocarde. 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. Ces

résultats pourraient conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'immunité chez les patients présentant des pathologies ischémiques cardiaques.

16027 La forme atrophique (Atrophie Géographique (AG) ou encore sèche tardive) de la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) se caractérise par une zone d'atrophie de l'épithélium pigmentaire et des photorécepteurs (PR) caractérisée par la mort de ces cellules qui s'accroît progressivement et conduit à une perte de la vision centrale.

Nous avons récemment montré que de nombreux macrophages (MP) inflammatoires sous-rétiniens provenant de la circulation sanguine sont présents dans la zone d'atrophie mais également à la périphérie de cette lésion. Ces MP secrètent des interleukines dont l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF qui sont responsables directement ou indirectement de la mort des photorécepteurs. Aujourd'hui il n'existe pas de thérapie à proposer aux patients atteints d'atrophie géographique. L'inhibition de l'inflammation permettrait de préserver les photorécepteurs. Malheureusement les molécules anti-inflammatoires présentes sur le marché présentent des contre-indications importantes (risque de glaucome et de cataractes) et ne sont donc jamais utilisées en première intention. Notre étude propose d'étudier le rôle protecteur (1) direct de molécules anti-interleukin (ie anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-TNF) ou (2) indirect de molécules protégeant les photorécepteurs du stress excitotoxique ou plus largement oxydatif dans deux modèles. Le premier modèle est un modèle classiquement utilisé depuis de nombreuses années. Un stress lumineux induit une accumulation primaire de MP dans l'espace sous-rétinien qui conduit secondairement à la dégénérescence des MP. Le deuxième modèle est plus récent, l'injection d'iodure de sodium induit une dégénérescence des RPE qui conduit secondairement à une mort des PR.

Ces deux modèles sont indolores et largement acceptés dans la communauté scientifique.

L'atrophie géographique et la DMLA est le résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires (photorécepteurs, microglies, épithélium pigmentaire rétinien et système vasculaire de la choroïde) et ne peut être complètement modélisée par des modèles cellulaires *in vitro* ou autre technique de remplacement. Pour cette étude il nous est indispensable d'utiliser un modèle souris.

Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105, nous avons limité au maximum le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement interprétables. Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les groupes d'animaux contrôles.

Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Les animaux seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Pour éviter toute souffrance animale, les animaux bénéficieront d'une anesthésie générale. Toutes les souris ont à disposition des nids en cellulose et des bâtons à ronger. Si nécessaire (exemple : agressivité des mâles), des maisonnettes en carton seront introduites dans les cages d'hébergement.

1368 souris maximum seront utilisées pour mener à bien ce projet.

16028 L'objectif de ce projet est de développer des stratégies thérapeutiques pour traiter une maladie métabolique rare d'origine génétique, causée par la dysfonction d'une enzyme.

La forme classique de cette maladie se caractérise par un coma en période néonatale pouvant conduire au décès en l'absence de traitement en urgence. Il existe également des formes moins sévères, chroniques, sans épisode aigu néonatal sévère et des formes se révélant par des troubles neurologiques lors d'épisodes aigus de stress métabolique (fièvre...).

A ce jour, le principal traitement repose sur un régime alimentaire extrêmement strict, limité en protéines. Ce régime est très efficace mais il doit être poursuivi à vie et ne permet pas de prévenir le risque de complications graves, parfois mortelles. Un tel régime altère de façon significative la qualité de vie. Certains patients peuvent bénéficier d'une transplantation hépatique qui certes guérit la maladie, mais demeure associée à un risque propre de rejet et de décès. L'efficacité de la transplantation hépatique dans cette maladie nous a conduit à proposer le projet ici présenté.

Notre objectif est de développer une stratégie de traitement de cette maladie métabolique par une approche de thérapie innovante basée sur l'utilisation d'ARN messagers, non-pathogènes, qui ont

montré qu'ils pouvaient corriger de manière stable des maladies où d'autres protéines sont manquantes après une seule administration.

Afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux dans ce projet, différentes formulations ont été préalablement testées sur des cellules de foie cultivées en laboratoire. Ceci a permis de sélectionner différents traitements candidats. Cependant la capacité de restauration de la protéine manquante dans le foie par ces ARN messagers ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier". Le modèle animal reste donc aujourd'hui incontournable pour vérifier le pouvoir thérapeutique des ARN messagers que nous utilisons.

Nous prévoyons donc de les tester dans un modèle murin de cette maladie métabolique.

Dans l'optique de réduire au maximum l'utilisation de ces souris malades, ces formulations ont été préalablement testées par nos collaborateurs chez une souche de souris saines (afin de sélectionner les traitements les plus efficaces pour restaurer l'enzyme déficitaire).

Nous utiliserons les deux formulations d'ARN messagers thérapeutiques les plus efficaces pour restaurer l'enzyme défectueuse au niveau des cellules du foie.

Nous effectuerons une première expérience visant à évaluer l'efficacité de ces formulations chez des souris génétiquement modifiées qui présentent la maladie en injectant les formulations à des nouveaux malades (Etude de survie). Puis si l'efficacité est avérée, nous effectuerons une étude de pharmacocinétique / pharmacodynamique sur les 2 premières semaines de vie de souriceaux malades.

Au total, 360 souris seront utilisées sur une période de 3 ans. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'étude.

Nous allons utiliser des procédures de raffinement pour éviter la souffrance des souris lors de prélèvements sanguins et pendant l'injection du vecteur thérapeutique, en particulier pour éviter le cannibalisme. Au moment de l'injection ; la mère sera éloignée afin de minimiser son stress. Les souriceaux seront recouverts de sciure de la cage de la mère et replacés rapidement dans la cage. Une surveillance régulière sera mise en place et des points limites adaptés ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les souris seront gardées dans des portoirs ventilés dans lesquels nous ajouterons du coton, une maisonnette et des bâtonnets à ronger. L'enrichissement social des souris sera garanti en évitant tout isolement prolongé.

Cette étude permettra de faire la preuve de concept de l'efficacité de cette thérapie innovante chez la souris, ouvrant la voie du développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique chez l'homme.

16029 La néphronophtose 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 et nécessite le recours à la dialyse ou à la transplantation rénale, deux procédures lourdes et coûteuses. Actuellement, aucun traitement ne permet d'éviter aux patients d'évoluer vers l'insuffisance rénale terminale.

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.

L'étude proposée ici a pour but de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la destruction du tissu rénal et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques capables d'enrayer le développement de la maladie.

Compte tenu de l'absence de modèle cellulaire permettant l'étude d'un rein *in vitro*, il n'a pas été possible de substituer des approches *in vitro* aux modèles murins impliqués dans ce projet.

Les objectifs de ce travail sont :

1/ d'élucider le rôle de facteurs de transcription et de molécules pro-inflammatoires identifiées *in vitro*. A cette fin, nous croiserons des lignées de souris génétiquement modifiées : l'une reproduisant les signes cliniques et histologiques de la pathologie humaine et les autres portant une mutation qui abolit l'expression de ces molécules pro-inflammatoires.

2/ de comprendre le rôle du recrutement de cellules inflammatoires dans la détérioration du parenchyme rénal. Pour cela, nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiées qui récapitule les signes cliniques et histologiques de la pathologie humaine. Les traitements permettant d'abolir le recrutement de cellules inflammatoires 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).

Ces expériences utiliseront un maximum de 500 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.

Dans le respect de la règle des 3 R, 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.

Compte tenu de l'absence de modèle cellulaire permettant l'étude d'un rein *in vitro*, il n'a pas été possible de substituer des approches *in vitro* aux modèles murins impliqués dans ce projet.

Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats. 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 de la néphronophtise et permettre le développement de médicaments capables de limiter sa progression.

16030 L'obésité est un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Actuellement, plus de 650 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 »). Seules les interventions chirurgicales permettent une réduction à long terme du poids corporel. Cependant, les risques et effets secondaires liés à ces chirurgies 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.

Afin d'envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux connaître les phénomènes biologiques qui régulent la prise alimentaire et le poids corporel. Dans ce contexte, le cerveau est un organe d'une extrême importance car c'est lui qui détermine ce que l'on nomme la « balance énergétique », à savoir l'équilibre entre le stockage et la dépense de calories et par extension le gain ou la perte de poids.

Notre projet vise à étudier le rôle d'une protéine au sein de certains neurones, responsables de la satiété. Cette protéine participe à la détection des niveaux d'énergie et de nutriments au sein des neurones, de même qu'au recyclage d'autres protéines lorsque les niveaux d'énergies sont trop bas. Pour ce faire, nous étudierons un modèle de souris génétiquement modifiées où cette protéine est absente de nos neurones d'intérêt. Ces souris seront comparées à d'autres souris de la même fratrie chez qui la protéine est toujours présente. Les conséquences de l'absence de cette protéine sur la régulation de la balance énergétique seront révélées au travers de diverses procédures expérimentales, allant de l'exposition à un régime riche en calories à l'injection de molécules qui influencent l'appétit. Des expériences de neurochirurgie permettront d'injecter un virus afin de rendre les neurones fluorescents, pour étudier leurs caractéristiques morphologiques et électriques. Les informations apportées par ce projet nous permettront d'accroître nos connaissances sur la régulation

du poids corporel et seront cruciales pour déterminer si cette protéine représente une cible thérapeutique intéressante pour le développement d'un nouveau médicament.

Nous utiliserons au total un maximum de 1656 souris adultes (âgées d'au moins 8 semaines) sur 5 ans. La souris représente un modèle de choix pour notre projet de 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 graisse. 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. 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 (matériel de nidification, bâtonnet de bois à ronger et tunnel en carton pour se cacher). 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 acclimatés aux pièces d'hébergement et manipulés fréquemment, afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Enfin, pour les procédures impliquant une neurochirurgie, les souris sont placés sur des tapis chauffant pour prévenir toute hypothermie et un protocole d'anesthésie et d'analgésie péri-opératoire est en place, afin de garantir la bonne prise en charge de nos animaux.

16031 Le processus fibrosant, c'est-à-dire la formation excessive de tissu conjonctif fibreux en réponse à une atteinte tissulaire souvent inflammatoire, est à l'origine de nombreuses maladies dites 'fibroses'. Elles se traduisent par une rigidité anormale des organes (poumon, foie, rein, cœur, peau...) pouvant avoir à terme, des conséquences létales. Parmi les besoins médicaux que nous avons identifiés :

- la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF), qui touche environ 17000 personnes en France et 3 millions dans le Monde, est une maladie limitant l'espérance de vie des patients à moins de 2 ans après le diagnostic. Le traitement actuel des stades légers à modérés repose sur deux molécules dont l'efficacité reste insatisfaisante.

- la stéatose hépatique non alcoolique (NASH) ou maladie 'du foie gras ou des sodas' est une inflammation du foie qui évolue vers la fibrose. C'est une maladie en pleine expansion. Elle est trouvée chez 20 à 30% de la population dans les pays développés. Cette fibrose hépatique est l'étape précédant les cirrhoses et accroît fortement le risque de cancer du foie.

- les néphropathies chroniques, dont l'évolution, indépendamment de leur origine, est marquée par le développement progressif de lésions fibrosantes rénales, conduisant les patients à une insuffisance rénale terminale. Plus de 82000 personnes sont concernées en France.

Pour la plupart de ces maladies, il n'existe pas de thérapie spécifique et les patients doivent recourir à des greffes d'organes.

Nous avons décidé de nous investir dans la recherche de nouvelles approches thérapeutiques capables de s'opposer au processus fibrosant dans le poumon, le foie ou le rein. Nos projets commencent par l'identification de cibles, la validation des mécanismes d'action cellulaires envisagés et la mise en évidence *in vitro* sur des cellules ou des tissus de l'activité de nos composés sur ces mécanismes. Ensuite, lorsque les molécules ont montré une sélectivité et un effet *in vitro* suffisants et que leurs propriétés pharmacocinétiques le permettent, nous devons les tester dans des modèles plus complets récapitulant la complexité de la pathologie. Dans ce but, et en nous appuyant sur les données de la littérature, nous souhaitons développer des modèles de fibrose chez la souris.

Dans le cadre de ce projet, plusieurs milliers de molécules seront produites et testées *in vitro* avant d'en sélectionner une dizaine pour l'évaluation *in vivo*. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire, nous utilisons un logiciel de lois statistiques permettant de calculer le nombre minimum de souris indispensable pour montrer que l'effet de nos composés est significatif par rapport aux animaux malades contrôles.

Nous avons aussi mis en place une plateforme d'imagerie permettant de suivre l'évolution de la maladie et de l'efficacité de nos composés sans avoir à mettre séquentiellement des animaux à mort.

Le nombre total d'animaux qui pourraient entrer dans ce projet serait de 3000 sur une période de 5 ans. Tous les candidats médicaments ne seront pas testés dans tous les modèles de fibrose ; ainsi ce nombre théorique maximum ne sera pas atteint.

Les groupes d'animaux dans les études resteront ceux formés pendant l'acclimatation. Certains de nos modèles peuvent apporter de l'inconfort. Nous avons donc établi une liste de points limites au-delà desquels les traitements seraient suspendus ou arrêtés.

Enfin, la veille de la littérature nous permettra de remplacer certaines procédures de cette demande d'autorisation de projet par de nouveaux modèles, tout aussi pertinents mais présentant moins d'impact sur le bien-être animal. Ces nouveaux modèles feront alors l'objet d'une nouvelle demande d'autorisation.

16032 La crête neurale des vertébrés est une structure embryonnaire transitoire composée de cellules donnant naissance à un très grand nombre de types cellulaires parmi lesquels on peut citer la quasi-totalité des mélanocytes (cellules qui pigmentent la peau), les cellules gliales et certains neurones du système nerveux périphérique (dont les cellules de Schwann qui sont responsables de la formation de la myéline le long des nerfs périphériques) et entérique (composant les ganglions le long de l'intestin, responsables de la contractilité de celui-ci). Plusieurs maladies congénitales graves ont pour origine une anomalie de ces cellules, regroupées sous le terme de neurocristopathies. L'étude des bases génétiques et physiopathologiques de certaines de ces maladies est au centre de nos projets, ce afin de mieux comprendre leurs bases physiopathologiques et moléculaires (identifier de nouveaux gènes ou mécanismes post-transcriptionnels à l'origine de ces maladies).

Nous cherchons à déterminer le rôle d'un nouveau mécanisme de régulation post-transcriptionnel, le RNA editing. Pour cela, nous avons généré un modèle de souris mutées pour un gène contrôlant la modification d'intérêt et nous étudions l'impact sur la formation et la survie des mélanocytes, du système nerveux entérique et des cellules de Schwann. En parallèle, nous souhaitons croiser ce modèle avec d'autres mutants murins (3 mutants différents) pour déterminer si cela permet de corriger les défauts observés. Enfin, nous souhaitons invalider notre gène d'intérêt après la naissance dans les cellules gliales après injection de tamoxifène afin de déterminer si cette modification post-transcriptionnelle est importante au cours du maintien de ces cellules dans le système nerveux périphérique (myéline et cellules gliales entériques).

Le développement de la crête neurale (transition épithélio-mésenchymateuse puis migration des cellules à travers l'embryon) est un phénomène dynamique et transitoire. L'étude des anomalies du développement de la crête neurale ne peut être réalisée *in vitro* car elle nécessite des interactions entre les différents feuillets embryonnaires pour sa mise en place. C'est pourquoi le recours à l'utilisation d'un modèle animal est indispensable afin de comprendre comment les mutations d'intérêts impactent le développement de cette structure spécifique aux vertébrés

Au total, 312 souris mutantes (embryons E18.5, nouveau-nés ou animaux plus âgés) seront générées à l'aide de croisements adéquats et les souris mutantes euthanasiées dès l'apparition de phénotypes. L'ensemble des souris seront maintenues dans des cages contenant des enrichissements (nids, maisons...). Pour limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, une surveillance journalière sera mise en place et des points limites ont été établis. La réalisation *in vitro* d'études préliminaires et l'utilisation de modèles cellulaires complémentaires aux modèles murins proposés nous permettront de réduire le nombre d'animaux utilisés selon la règle des 3R.

Ce projet permettra sur une période de 5 ans de déterminer de nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de ces maladies. A terme, ces études permettront de favoriser le diagnostic chez les patients et d'améliorer les approches de thérapie cellulaire.

16033 Les produits biologiques d'origine animale sont couramment utilisés par la communauté scientifique dans des tests biologiques et de diagnostic, la mise au point de méthodes analytiques pour des futures études précliniques réglementaires, ou dans des analyses réalisées dans les études précliniques ou enfin pour obtenir des données de référence sur une souche particulière d'animaux préalablement à des études précliniques réglementaires. Ce projet a pour but de mettre à la disposition de la communauté scientifique ou de l'industrie divers produits biologiques (sang et ses dérivés, urines, feces, liquide cébrospinal, ...) en provenance du lapin, du rat et de la souris. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode *in vitro* permettant de synthétiser ces produits biologiques.

Le prélèvement des produits biologiques se fera dans le respect des recommandations éthiques (volume sanguin prélevé et de temps de récupération) et les méthodes générant le moins de stress seront privilégiées. Afin d'améliorer le bien-être des animaux, les prélèvements plus invasifs que la collecte de sang, urines ou fécès seront réalisés après une anesthésie générale de l'animal.

Les animaux seront hébergés dans des conditions environnementales adaptées à leur espèce, en groupes sociaux dès que cela est possible (rat, souris femelle) et disposeront d'éléments à ronger, de jouets, de matériel de nidification (rat, souris), de plateforme de repos (lapin).

Le nombre d'animaux utilisé sera défini au plus juste en fonction des volumes de produits demandés et des recommandations éthiques et est estimé à 6500 animaux (2500 rats, 3000 souris et 1000 lapins). A des fins de réduction, les prélèvements sont prioritairement réalisés sur des animaux de réforme ou surnuméraires provenant d'un projet antérieur.

16034 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. La survenue d'un AVC est favorisée par des facteurs de risque vasculaires (FDRV), en particulier l'hypertension artérielle (HTA), le diabète et l'hyperglycémie aiguë, eux-mêmes associés au mode de vie (tabagisme, sédentarité, alcoolisme, obésité). Cependant, à ce jour, peu d'études ont examiné comment ces FDRV influencent l'apparition et la sévérité de l'AVC. Notre hypothèse est que ces FDRV aggravent la réponse inflammatoire cérébrale consécutive à l'AVC et/ou interfèrent avec les mécanismes de réparation cérébrale post-AVC.

Les objectifs de ce projet sont donc de déterminer l'impact de l'HTA, du diabète et de l'hyperglycémie aiguë sur les dégâts cérébraux causés par un AVC ischémique ainsi que sur la réparation cérébrale post-AVC.

Pour cette étude, nous utiliserons un modèle d'AVC ischémique induit par une occlusion transitoire ou permanente, réalisée sous anesthésie et analgésie, d'une artère cérébrale chez la souris. Ce modèle sera combiné à une HTA (modérée ou sévère), un diabète, ou une hyperglycémie aiguë. Les souris soumises à une ischémie cérébrale combinée ou non à l'un de ces FDRV subiront différents examens (imagerie échographie-Doppler avant puis 1h et 2h après ischémie cérébrale, imagerie intravitale, dosages biologiques, tests des fonctions sensitivomotrice et cognitive) visant à déterminer la sévérité de l'AVC et la mise en place des mécanismes de réparation cérébrale et de récupération fonctionnelle post-AVC. Ainsi, un suivi neurologique de l'animal et des prélèvements sanguins seront réalisés à différents temps suivant l'AVC. Toute procédure invasive sera faite sous anesthésie et analgésie. Les animaux seront euthanasiés en fin d'étude et les tissus seront prélevés et stockés pour les analyses biologiques.

Ce projet nécessite 1020 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 (modèle d'AVC, type de FDRV) et le fait que certaines procédures impossibles à faire chez le même animal, imposent des groupes d'animaux différents. La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche *in vitro* ne

permet de rendre compte de l'impact des FDRV après ischémie cérébrale au cours du temps. Ce modèle d'AVC n'est à l'heure actuelle pas remplaçable. 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, journalière par l'animalier et bi-hebdomadaire par l'expérimentateur. 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.

16035 Les modifications des habitats liées aux activités humaines peuvent influencer profondément les traits d'histoire de vie des organismes qui les utilisent. Les habitats agricoles sont particulièrement soumis à ces modifications qui incluent la simplification et l'homogénéisation de l'environnement ainsi que la contamination par des produits phytosanitaires. Ces modifications de l'environnement rural peuvent avoir des conséquences importantes sur la reproduction et donc la persistance des populations.

Le projet consiste à examiner les performances de reproduction de crapauds épineux (*Bufo spinosus*) issus d'habitats contrastés (2 sites agricoles et 2 sites forestiers). Des couples (amplexus) d'individus adultes seront capturés et placés en captivité jusqu'à la ponte afin de mettre en relation le nombre et la qualité des oeufs avec la qualité des parents (phénotype) et leur habitat d'origine. Les adultes seront relâchés sur leur site de capture dès la ponte obtenue. Une partie de la ponte sera conservée au laboratoire jusqu'à l'éclosion afin de mettre en relation la durée et le succès de développement embryonnaire avec la qualité des parents (phénotype) et leur habitat d'origine. Le reste des oeufs sera immédiatement relâché sur le site de capture des parents. Enfin, 6 têtards par ponte seront maintenus au laboratoire jusqu'à la métamorphose afin de mettre en relation la durée et le succès de développement, ainsi que la morphologie des têtards avec la qualité des parents (phénotype) et leur habitat d'origine. Le reste des têtards sera relâché dès l'éclosion sur le site de capture des parents.

La règle des trois R a été prise en compte de la manière suivante :

-Remplacement : L'étude de l'influence de la qualité de l'habitat sur les performances de reproduction a des implications importantes à la fois pour la recherche fondamentale en écologie et la recherche appliquée. Ce projet porte spécifiquement sur le crapaud épineux (*Bufo spinosus*) en conditions contrôlées. Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation d'un modèle animal pour cette étude.

-Réduction : Le nombre d'individus sera réduit au minimum (10 couples par sites soit 40 couples au total, soit 80 individus adultes). Seule une fraction des têtards issus de chaque ponte sera conservée pour monitorer le développement larvaire (6 individus par ponte, soit un total de 240 têtards). Les oeufs et les têtards qui ne sont pas impliqués dans ces suivis seront relâchés sur le lieu de capture des adultes dès la ponte ou l'éclosion. Les 240 têtards gardés au laboratoire seront relâchés sur le lieu de capture des adultes dès la métamorphose.

L'étude concerne donc 80 individus adultes et 240 têtards (soit un total de 320 animaux).

-Raffinement : Tout au long de la procédure, les adultes, les oeufs et les têtards disposeront de conditions de maintien en captivité optimisées. Ils seront maintenus dans des aquariums dédiés, dont l'eau sera changée de façon hebdomadaire et auront un accès à la nourriture ad libitum. Un suivi journalier de l'état de chaque individu et de son aquarium sera effectué. L'avis du vétérinaire référent sera sollicité le cas échéant.

16036 Au cours de la dernière décennie, la radiothérapie interne vectorisée s'est imposée comme une méthode alternative de traitement des cancers extrêmement prometteuse. La possibilité de délivrer une dose de radioactivité de façon locale, directement dans la tumeur après administration systémique permet de traiter des cancers métastatiques et localement avancés qui ne pourraient pas l'être par les technologies existantes de chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie externe. Les excellents résultats de développement clinique d'agents de radiothérapie vectorisée pour le traitement de tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques (GEP-NETs) (obtention de l'autorisation de mise sur le

marché) ou pour le cancer de la prostate ciblant l'antigène membranaire spécifique a la prostate (PSMA) (Phase III) ont démontré le potentiel extraordinaire de cette approche. La radiothérapie interne vectorisée consiste en l'utilisation d'une molécule (typiquement un peptide ou peptoïde de 5 à 50 acides aminés) ciblant une protéine caractéristique d'un phénomène malin (typiquement un peptide enzyme ou un récepteur) et de son marquage par un radionucléide (typiquement par l'intermédiaire d'un macrocycle azoté), permettant ainsi de délivrer un rayonnement ionisant au sein de la tumeur (primaire, métastase ou ganglion lymphatique, etc.), à des fins d'imagerie (rayonnement gamma ou positon) et/ou de thérapie (rayonnement alpha ou beta). Afin de réaliser tout leur potentiel, les agents de radiothérapie ciblée vectorisée doivent néanmoins cibler les phénomènes tumoraux tout en limitant l'exposition des autres organes. L'objectif de ce projet consiste à évaluer la biodistribution sur animaux sains d'une série de candidats dérivés d'un peptide de ciblage des récepteurs cMet surexprimés dans un grand nombre de cancers, afin de déterminer une structure optimale vis à vis de la biodistribution et du temps de résidence dans certains organes clés (reins, moelle osseuse, foie etc.) et en mesurer par la suite le taux d'absorption tumoral sur deux modèles de tumeurs et confirmer la viabilité du composé pour une translation clinique à suivre.

Nous estimons qu'il faudra utiliser environ 160 souris (60 pour la biodistribution sur animaux sains de 10 agents candidats et 100 animaux porteurs de tumeurs sous cutanées pour mesurer par la suite le taux d'absorption tumoral de 5 agents candidats sélectionnés dans deux modèles de tumeurs différents) pour répondre à l'ensemble de nos questions durant les 3 ans prévus du projet.

La règle des 3R a été envisagée lors de l'élaboration du projet. La série de peptides candidats a d'abord été testée et sélectionnée *in vitro* afin de remplacer au maximum l'utilisation d'animaux. Le nombre d'animaux a été réduit, notamment par l'utilisation de l'imagerie non invasive pour suivre des modèles *in vivo* parfaitement décrits dans la littérature (modèle de xénogreffe de tumeurs en sous cutané). De plus, afin de raffiner au mieux les expérimentations, les animaux porteurs de tumeurs auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée au développement du cancer (euthanasie anticipée en cas d'atteinte des points limites) et tous les moyens nécessaires seront mis en oeuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, imagerie non invasive). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et 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 et des soins adaptés.

16037 La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une conséquence fréquente de l'obésité, entraînant un déclin progressif de la fonction hépatique, la fibrose, la cirrhose et souvent un carcinome hépatocellulaire. La fréquence de NASH a augmenté au cours des dernières années en raison de l'épidémie d'obésité. Nous avons démontré que, chez la souris, une protéine libérée par les cellules et les organes (foie, graisse, cœur, rein et muscle) est impliquée dans un réflexe primitif de la faim et stimule le comportement alimentaire par des mécanismes périphériques. Il s'agit notamment d'une augmentation de l'absorption du glucose dans les organes périphériques, de l'hypoglycémie, d'une augmentation de la glycolyse et de la lipogenèse, ainsi que d'une inhibition de la β -oxydation. L'inhibition de cette protéine, chez la souris, induit la perte de poids et réduit l'apport alimentaire. Sur la base de ces observations, nous déterminerons si l'inhibition de cette protéine peut prévenir ou traiter la NASH chez des modèles murins appropriés. Ce projet a été conçu dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de la NASH, due à sa complexité. Réduction : Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes transgéniques comparées aux animaux contrôles (nombre totale d'animaux = 3660). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. 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 (point limite) 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 et expérimenté sur le plan technique et par ailleurs formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute manipulation déjà rapportée dans la littérature.

16038 Les études de toxicologie par administration unique ou répétée sont réglementairement requises par les lignes directrices ICH (International Committee of Harmonization) /EMA pour les médicaments humains et vétérinaires. Ces études sont des pré-requis aux essais cliniques de phase I, II ou III. Elles visent à définir le profil de toxicité des produits à tester et donc orienter le suivi clinique des volontaires sains et patients incorporés dans les essais cliniques. Elles ont également pour objectif de définir le niveau de dose (marge de sécurité) pour la première administration à l'homme ou l'animal. Ces études incluent des évaluations toxico-cinétiques pour déterminer les taux d'exposition entraînant une toxicité. La durée des études de toxicologie varie en fonction du stade de développement du produit à tester et de sa posologie.

Les études de toxicologie sont réalisées sur le macaque *Cynomolgus* et le marmouset.

Compte-tenu du nombre d'études réalisées pendant les années précédentes, le nombre d'animaux maximum pour le présent projet (5 ans) est de 2 000 pour les macaques *Cynomolgus* et 500 pour les marmousets.

Le nombre d'animaux par groupe étant fixé par les lignes directrices, les études de toxicologie appliquent cependant autant que possible la règle des 3Rs.

- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum en accord avec les lignes directrices.
- les animaux sont hébergés en groupe avec un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, supports, ou hamacs, boîtes à nids, escaliers en bois ...) conformément à la directive européenne 2010/63/EU.
- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études.

Les études de toxicologie peuvent entraîner des signes d'inconfort ou d'intolérance voir la mort de l'animal en particulier à la dose la plus forte.

Pour quantifier cela, les animaux sont observés quotidiennement. Différents paramètres sont pris en compte tels que le comportement de l'animal, les signes cliniques observés, la perte de poids, une modification de la température corporelle, des changements au niveau de la consommation hydrique ou alimentaire. Suivant les observations, une décision est prise par le vétérinaire en concertation avec le responsable de projet, qui peut-être la mise en place d'un traitement, l'arrêt du traitement par le produit à tester et en cas extrême, en accord avec les points limites établis pour tout type d'étude, la mise à mort de l'animal. Ces points sont les suivants :

- Amaigrissement marqué >20%
- Baisse de la température corporelle < 33°C
- Résultats anormaux au niveau des paramètres hémato-biochimiques représentant un danger pour la vie
- Signes sévères de douleur ou de détresse

Sur la base des mesures et processus mis en place pour anticiper douleur et détresse comme décrit plus haut, ce projet est classé avec un degré de sévérité modéré.

16039 L'étude des effets pharmacologiques d'un candidat médicament sur le test d'observation neurocomportemental d'Irwin vise à caractériser ses propriétés pharmacologiques sur le système nerveux central (i.e. sur le comportement des animaux ainsi que sur la température corporelle). Des effets bénéfiques (i.e. thérapeutique comme antidépresseur, sédatif, anxiolytique, excitant,

myorelaxant...) mais aussi indésirables (dépresseur, inducteur de somnolence, émétique...) peuvent être détectés à l'aide de ce test.

Le principe du test d'observation neurocomportemental d'Irwin consiste à observer les animaux avant et après le traitement par le candidat médicament à l'aide d'une grille d'observation standardisée qui permet d'évaluer globalement ses propriétés sur le système nerveux central. La température corporelle des animaux est également contrôlée au cours de ce test. Il est très régulièrement cité dans littérature scientifique.

Ces études sont réalisées au bénéfice des patients incorporés dans les essais cliniques pour prévenir d'éventuels effets indésirables et/ou augmenter la probabilité de tester des candidats médicaments efficaces dans les essais cliniques.

Le rat et la souris sont les espèces les plus couramment utilisées dans la littérature scientifique pour l'étude de nouveaux candidats médicaments sur système nerveux central.

Concernant la règle des 3Rs :

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger, incitation au fouissement ...)

- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés par des approches statistiques optimisées.

- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études.

Les études des effets pharmacologiques de candidat médicament sur le test d'observation neurocomportemental d'Irwin (effet sur le système nerveux central) sont réalisées à des doses non toxiques et donc non susceptibles d'entraîner la mort ou des signes d'intolérance. Dans les cas contraires, les animaux moribonds seront mis à mort en concertation avec le vétérinaire du centre et le responsable du projet.

Les points limites pour ce projet sont :

- Amaigrissement marqué (>20% par rapport au 1er jour de traitement pour les études dont le dernier temps d'observation post traitement est supérieur à 48 heures)

- Douleurs observées par des cris et/ou agressivité de l'animal lors des observations

Le Test d'observation neurocomportemental d'Irwin est classé avec un degré de sévérité légère car l'acte susceptible de générer le niveau de douleur le plus élevé est constitué par l'administration du candidat médicament.

Cette étude est réalisée sur des groupes de 6-8 rats ou souris maximum. Cet effectif par groupe correspond au nombre minimum d'animaux nécessaires permettant de révéler les effets recherchés avec la sensibilité statistique requise dans ce type d'étude.

Compte tenu du nombre d'études réalisées pendant les années précédentes, le nombre d'animaux maximum pour le présent projet (5 ans) est de 1200 rats et 400 souris.

Ce projet est requis par les autorités réglementaires en préalable aux essais des protocoles thérapeutique chez l'Homme.

16040 Les étiologies du cancer du foie sont en grande partie connues. Ce sont les infections chroniques causées par les virus des hépatites B et C, l'alcool et les maladies métaboliques liées à l'obésité. Parmi elles, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est un problème majeur, puisque l'on estime à 250 Millions le nombre de porteurs chroniques dans le monde.

Il existe quelques modèles de souris transgéniques développant un cancer du foie, dont un se rapproche du cancer du foie lié à l'infection par le VHB. Cent pour cent des souris développent un cancer du foie entre 18 et 24 semaines. Ce modèle a été utilisé pour mieux comprendre les mécanismes d'apparition des tumeurs du foie chez la souris et les résultats indiquent qu'il possède des points communs avec certains cancers du foie humains.

Chez l'Homme, le cancer du foie détecté à un stade avancé est de très mauvais pronostic, en raison du peu de traitements disponibles. Il n'existe depuis 10 ans qu'une seule molécule administrée en

première ligne dans ce cas, le Sorafenib. Mais le domaine est en train de bouger, entre autres avec l'introduction de l'immunothérapie. Dans ce contexte, si les souris transgéniques s'avèrent sensibles au Sorafenib, comme les cancers du foie humains, elles représenteraient un excellent modèle pour tester de nouvelles molécules à visée thérapeutique, seules ou en combinaison avec le Sorafenib.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer l'efficacité du Sorafenib sur les souris transgéniques dont nous disposons.

La première procédure décrit la génération des souris nécessaires à l'expérience. La seconde procédure décrit le traitement administré aux souris. L'apparition des premières tumeurs sera visualisée par imagerie. Dès cette apparition, les souris recevront le traitement à différentes doses (quatre doses, 15 souris/dose). L'efficacité du traitement à ralentir la croissance des tumeurs sera elle aussi évaluée par imagerie. Grâce au suivi longitudinal par imagerie, le nombre d'animaux nécessaires pour conclure à l'effet du traitement sera réduit, puisque cette technique permet la formation de groupes homogènes à partir d'un nombre d'animaux minimal. Un total de 84 souris, incluant les reproducteurs, sera nécessaire. L'utilisation d'anesthésie, la définition de points limites suffisamment précoces et prédictifs et la surveillance des animaux limiteront au maximum la souffrance animale. De plus, les animaux ne rentrant pas dans le protocole de traitement, comme les reproducteurs, seront mis à mort sans délai, de façon à prévenir toute souffrance.

Les résultats permettront d'obtenir des données sur la sensibilité des souris transgéniques au Sorafenib, « Gold Standard » actuel dans le traitement du cancer du foie. Si les tumeurs s'avèrent sensibles, la dose utile et le temps de traitement seront considérés comme traitement de référence dans les études ultérieures d'efficacité *in vivo* de nouvelles molécules.

16041 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie le plus souvent liée au tabagisme. En France, la BPCO concerne 4 millions de personnes et elle sera bientôt la 4ème cause de mortalité. Cette maladie se caractérise notamment par une fibrose bronchique et péri-bronchique, et par une destruction du tissu pulmonaire, associés à un déclin irréversible de la fonction respiratoire. Par ailleurs, les patients atteints de BPCO sont victimes d' « exacerbations », épisodes d'aggravation aiguës des symptômes respiratoires. Ces exacerbations sont causées par des infections virales ou bactériennes, et elles favorisent l'évolution de la maladie. Les mécanismes du remodelage tissulaire et le rôle joué par les exacerbations sont mal compris, et ce processus n'est pas ciblé par les thérapeutiques actuelles. Nous souhaitons mettre en place au laboratoire un modèle de souris BPCO, qui reproduise les lésions de destruction du tissu pulmonaire. Ces lésions sont, en partie due à une quantité augmentée de molécules de dégradation. Nous administrerons donc des gouttelettes contenant ces molécules de dégradation au niveau du nez de la souris, qui inhalera par réflexe ces gouttelettes et mettra donc en contact les molécules de dégradation avec les voies respiratoires. Il s'agit ici d'un protocole classique, largement utilisé dans des études précédentes. Nous simulerons les infections virales et bactériennes grâce à deux agents chimiques administrés également sur le nez de la souris. Le but de ce projet est de mettre en place ces modèles, puis d'imager le cœur et le poumon de ces souris par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). La réalisation de ce projet permettra de mieux caractériser le modèle murin de BPCO et les lésions pulmonaires et cardiaques. A terme, la mise au point de cette technique permettra de tester l'efficacité de nouvelles molécules pour le traitement de la BPCO. Pour ce faire, 144 souris seront utilisées. Afin de respecter 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 analgésie locale, raffinement des conditions d'hébergement, par exemple avec des cylindres) 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 : il n'existe pas de modèle *in vitro* actuellement permettant d'étudier la pathophysiologie de la BPCO, maladie complexe touchant plusieurs composants (tels que le muscle lisse bronchique,

l'épithélium et les cellules inflammatoires) et mettant en jeu plusieurs organes (moelle osseuse, compartiment vasculaire et poumon). Grâce à un modèle de souris BPCO et la mise en place de cette nouvelle méthode d'imagerie pulmonaire et cardiaque de façon non invasive, nous pouvons envisager une meilleure compréhension des phénomènes.

16042 Durant le développement embryonnaire, une cellule souche pluripotente va pouvoir se différencier en un état cellulaire mature et spécialisé. La vision de cet état différencié comme étant irréversible a été largement remis en cause ces dernières années, notamment grâce à des travaux démontrant la possibilité de reprogrammer une cellule différenciée en une cellule souche embryonnaire grâce à un cocktail de 4 facteurs de pluripotence. Le processus de reprogrammation implique une dédifférenciation et une réacquisition de plasticité pour la cellule. Ces 2 caractéristiques sont également impliquées dans l'initiation cancéreuse, au cours de laquelle les mutations de gènes régulateurs conduisent à une perte d'identité cellulaire et à une réacquisition de plasticité cellulaire. En accord avec ces observations, il a récemment été montré que l'expression transitoire des 4 facteurs de pluripotence chez la souris conduisait au développement de tumeurs bénignes dans divers tissus laissant supposer des mécanismes initiateurs communs aux reprogrammations pluripotente et oncogénique. Au contraire, une étude récente montre que l'expression cyclique des 4 facteurs de pluripotence (2 jours d'induction suivis de 5 jours de « récupération ») chez des souris modèles de vieillissement précoce améliorait le phénotype associé à l'âge et la survie de ces souris, sans induire la formation de tumeurs. C'est dans ce contexte que ce projet est proposé pour étudier les effets de la reprogrammation cyclique sur le développement tumoral. Les études porteront sur deux modèles murins développant un cancer du poumon et un cancer du côlon. Ces animaux recevront un traitement dans l'eau de boisson dont la fréquence et la durée seront variables permettant ainsi d'induire une reprogrammation cyclique.

Cette étude permettra d'améliorer notre compréhension des phénomènes de plasticité cellulaire induite dans les cancers qui sont encore très mal connus. Elle permettra également de savoir si perturber l'identité cellulaire peut constituer à terme une nouvelle approche de lutte contre le développement cancéreux.

Les modèles murins utilisés dans cette étude sont déjà couramment utilisés au laboratoire et bien décrits. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en classe de gravité modérée.

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.

Nous avons généré un certain nombre de résultats *in vitro* afin de savoir si l'induction d'un programme pluripotent peut ou non affecter la transformation cellulaire. Cependant, ces approches ne permettent pas de prendre en compte certains paramètres comme les interactions entre la tumeur et son environnement qui sont de plus en plus reconnues comme primordiales dans la progression tumorale. La souris reste donc un modèle de choix pour étudier les potentielles interactions entre des programmes pluripotent et oncogénique et définir si le premier a un impact bénéfique ou délétère sur le second.

1857 souris seront utilisées pour réaliser ce projet.

16043 Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et les plus agressives chez l'adulte. Malgré un traitement lourd associant chirurgie (résection pour réduire la taille de la tumeur), chimiothérapie et radiothérapie, la survie moyenne des patients n'excède pas 15 mois en raison de l'apparition, quasi-systématique, de récidives. Le principal facteur supposé pouvant expliquer l'apparition de ces récidives est la repousse de cellules très invasives se propageant à partir de la masse tumorale et qui ne sont donc pas éliminée par résection chirurgicale.

Bien que la résection fasse partie intégrante du traitement actuel des glioblastomes, la majorité des études pré-cliniques réalisées chez l'animal a négligé son impact sur la progression tumorale.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, a pour but d'étudier chez la souris, les conséquences de la résection tumorale sur des cellules tumorales résiduelles après chirurgie, pouvant favoriser l'apparition de récurrences appelées les « Cellules Initiatrices de Tumeur Post-Résection » (CITPR).

L'hypothèse de travail de ce projet est, qu'après résection, les CITPR migrent vers, et le long des vaisseaux sanguins tumoraux et acquièrent des caractéristiques tumorales plus agressives favorisant ainsi les récurrences. Nous envisageons d'étudier chez la souris le comportement des cellules tumorales après résection chirurgicale grâce à la microscopie intravitale. Cette technique permet de suivre, sur animal endormi, les cellules tumorales de manière individuelle et dynamique. Une analyse moléculaire des cellules tumorales et une analyse histologique notamment des vaisseaux sanguins permettront de comprendre les mécanismes induisant les CITPR

Mieux comprendre le comportement des CITPR permettrait d'adapter les procédures chirurgicales de résection, d'identifier des cibles thérapeutiques limitant leur agressivité et ainsi d'améliorer la prise en charge des glioblastomes chez l'Homme.

Pour ce projet, nous utiliserons au total 290 animaux.

Remplacer : Des résultats préliminaires du laboratoire couplé à des données de la littérature nous mènent à penser que les modifications de comportement des cellules tumorales après un traitement sont intimement dépendantes de leur environnement. Or le micro environnement tumoral est un système complexe aux paramètres extrêmement nombreux et dont la plupart sont inconnus : il nous est donc impossible de recréer totalement 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 réunis.

Réduire : Le 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 utilisés.

Raffiner : En accord avec les recommandations internationales, en particulier dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis individuellement et quotidiennement afin d'assurer leur bien-être. Celui-ci sera évalué selon une grille de score. Si nécessaire, les expérimentations seront stoppées avant toute souffrance.

16044 Les maladies lysosomales sont des maladies génétiques rares qui entraînent des anomalies osseuses, une petite taille, une surdité, une cécité et une atteinte cardiaque. L'efficacité des traitements actuels reste limitée par le fait qu'ils n'atteignent pas le cerveau ou le système oculaire et sont très mal distribués dans les tissus faiblement vascularisés comme les cartilages. Le besoin médical reste donc très important pour ces patients qui sont lourdement handicapés par la maladie.

Notre entreprise dispose d'un composé qui module la synthèse de certains sucres complexes qui s'accumulent dans certaines de ces maladies. Une première preuve de concept *in vitro* a été obtenue sur des cellules de malades atteints de la maladie lysosomale d'intérêt. Pour évaluer l'efficacité de notre composé dans sa globalité, il est indispensable de recourir à l'utilisation de modèles animaux pertinents qui intègrent toute la complexité des réactions physiologiques des pathologies humaines. Les procédures expérimentales permettant de démontrer l'efficacité de notre composé sont de durées moyennes à longues (de 3 à 15 mois), en fonction du type de maladie lysosomale étudiée.

Nous estimons à environ 1715 le nombre d'animaux (environ 1435 souris et 280 rats) utilisés dans les études dédiées à ce projet sur une durée de 5 ans.

Toutes les dispositions nécessaires en matière d'hébergement, d'observation et de soins aux animaux sont prises afin d'assurer les meilleures conditions de vie aux animaux. Les élevages ainsi que les expérimentations sont réalisés dans le respect du principe des 3R. L'anesthésie et l'analgésie seront également utilisées lors de manipulations invasives ou pouvant induire un stress. Notre composé ayant déjà été étudié dans une autre indication, nous avons une bonne connaissance des doses tolérées, évitant ainsi les risques de toxicité chez l'animal.

16045 Le mot cancer, qui provient du mot latin homonyme signifiant « crabe », désigne une prolifération anormale des cellules. Presque tous les tissus de notre organisme peuvent être affectés par ce dérèglement dont les causes, les évolutions et les conséquences sont très diverses. Le cancer n'est

pas une maladie unique, mais un ensemble de maladies où des altérations génétiques successives conduisent des cellules normales vers une prolifération anormale et incontrôlée.

Le cancer est l'une des causes majeures de mortalité dans le monde, à l'origine de 7,4 millions de décès en 2004, soit 13% de la mortalité mondiale. D'après les projections, ce nombre devrait augmenter pour atteindre, 12 millions en 2030 à l'échelle mondiale.

Le but de notre recherche est d'identifier des candidats médicaments permettant de traiter le cancer. Pour ce faire, nous sélectionnons les molécules agissant sur des cibles d'intérêts en fonction premièrement de leur activité dans différents tests cellulaires *in vitro* et deuxièmement de leur efficacité dans des modèles pharmacologiques *in vivo*. Nous avons mis en place un processus de sélection des molécules via des tests cellulaires ou acellulaires *in vitro* qui permet de réduire considérablement le nombre de composés à tester chez l'animal. Ce projet respecte la règle des 3Rs. Les expériences sur des animaux ne sont effectuées que lorsqu'aucune méthode alternative n'est possible.

Les composés les plus avancés seront testés sur des modèles animaux relevant de la pathologie humaine d'intérêt. Des cellules cancéreuses humaines ou murines seront administrées aux animaux. Une fois la tumeur développée, les animaux seront traités avec des molécules actives *in vitro* ou des médicaments de référence. L'efficacité des molécules sera évaluée en mesurant l'évolution de la taille des tumeurs, l'expression de différents biomarqueurs, l'expression de gènes d'intérêt, l'histologie des tumeurs et l'exposition aux composés testés. Les animaux seront observés quotidiennement et des points d'arrêt précoce (points limites) seront déterminés afin de veiller au bien-être des animaux.

En amont, des études de pharmacocinétique *in vivo* seront également réalisées pour déterminer l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des molécules. Les composés montrant le meilleur compromis entre leur activité pharmacologique *in vitro* et leurs caractéristiques pharmacocinétiques *in vivo* seront sélectionnés pour être testés dans les modèles pharmacologiques *in vivo*.

Au regard de l'expérience acquise dans ce domaine, nous prévoyons d'utiliser environ 1500 souris pour les études pharmacologiques de tolérance et d'efficacité anti-tumorale, 1800 souris et 210 rats pour les études de pharmacocinétique, par an. Soit un nombre total de 16500 souris et 1050 rats sur 5 ans.

Toutes les dispositions nécessaires en matière d'hébergement, d'observation et de soins aux animaux seront prises afin d'assurer les meilleures conditions de vie aux animaux. Toutes les interventions potentiellement douloureuses seront réalisées sous anesthésie.

16046 Une fonte musculaire sévère est associée à de nombreuses pathologies chroniques comme le cancer, le SIDA, l'insuffisance cardiaque. Cette perte de masse musculaire est très délétère pour le patient, affectant sa qualité de vie mais aussi réduisant la réponse aux traitements et la survie. La compréhension de cette atrophie musculaire et le développement de traitements efficaces représentent un réel enjeu clinique. Des molécules de l'inflammation, appelées cytokines, produites notamment par les cellules immunitaires, les tumeurs ou le muscle lui-même, induisent un programme cellulaire conduisant à une fonte du muscle (diminution de la synthèse des protéines musculaires et une augmentation de leur dégradation) et une perte de force musculaire.

Nous souhaitons développer un nouveau modèle de souris génétiquement modifiées exprimant dans le muscle squelettique un gène modifié impliqué dans la régulation de la masse musculaire. Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués la fonte musculaire induite par la cachexie et d'identifier de nouvelles cibles moléculaires intéressantes pour le développement de nouveaux traitements. La durée initiale du projet a été acceptée pour 3 ans et demande à être prolongée de 2 ans pour une durée cumulée de 5 ans.

Remplacement: Des expériences dans les cellules seront réalisées quand cela sera possible mais le modèle murin est essentiel pour étudier fonctionnellement le muscle et également étudier l'impact des défauts musculaires sur le reste de l'organisme.

Réduction: Nous utiliserons le nombre d'animaux minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement: Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux au quotidien. Une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée.

Nombre d'animaux : 384 souris.

16047 Les tumeurs osseuses primitives ont une faible incidence (300 nouveaux cas par an en France) affectant préférentiellement des adolescents et jeunes adultes (pic de survenue à 15 ans pour les sarcomes d'Ewing et 18 ans pour les ostéosarcomes, les deux tumeurs osseuses primitives les plus fréquentes). Malgré des avancées dans la prise en charge de ces tumeurs par des cures de polychimiothérapie moins agressives associées à une chirurgie large de la tumeur en zone saine et conservation du membre, les taux de survie demeurent très faibles pour les formes métastatiques d'emblées ou pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie. En présence de métastases pulmonaires, la survie des patients sur 5 ans chute à 20%.

TRAIL (Tumor necrosis factor-related Apoptosis Inducing Ligand) est une molécule pro-apoptotique pouvant constituer un gène médicament intéressant induisant la mort programmée de la cellule, c'est à dire l'apoptose, des cellules tumorales tout en épargnant les cellules saines. TRAIL permet l'induction de la mort programmée des cellules par activation de petites molécules appelées caspases 8, 9 et 3. TRAIL envoie le signal de mort grâce à sa liaison sur des récepteurs de mort (Death Receptor 4 ou 5) exprimés à la surface des cellules tumorales. Concernant les tumeurs osseuses primitives, son efficacité a été démontrée *in vitro* sur des cellules de sarcome d'Ewing. Récemment, une étude préclinique a montré l'efficacité de TRAIL sur des modèles animaux d'ostéosarcome ou de sarcome d'Ewing.

Le projet portera sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques des métastases pulmonaires par l'utilisation d'un transgène codant la séquence génétique de TRAIL délivré par aérosol au moyen d'un agent de transfection synthétique. Ces approches seront testées *in vivo* dans des modèles murins possédant une greffe d'ostéosarcome ou de sarcome d'Ewing qui présentent des métastases pulmonaires, celles-ci conditionnant la survie du patient.

330 souris NMRI Nude, un modèle animal n'ayant pas de système immunitaire, seront utilisées dans ce projet. Soit 165 souris pour le modèle Ostéosarcome et 165 souris pour le modèle sarcome d'Ewing.

Ce projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R.

Pour le remplacement, des expériences *in vitro* préalables ont montré l'efficacité de TRAIL pour induire l'apoptose des cellules tumorales. Cependant, elles ne permettent pas de mimer un micro environnement anatomique et tumoral complexe.

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro* et l'éventuelle application clinique. Des techniques d'imagerie *in vivo* (bioluminescence et fluorescence) permettront de réduire le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative. 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, une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

16048 La consommation de fructose, qui a fortement augmenté ces dernières années notamment par l'utilisation de sirop riche en fructose dans les produits transformés, est parallèle à celle du nombre de patients atteints d'obésité. Ces données suggèrent un rôle de ce sucre dans le développement des désordres métaboliques et ont conduit l'Anses à émettre des recommandations pour développer des recherches plus approfondies sur « le lien entre consommation de sucres et pathologies associées ».

Une question qui n'a jamais été adressée directement est la capacité du cerveau à détecter le fructose. Cette question est justifiée par le nombre croissant d'études montrant que la consommation de fructose peut, chez l'homme et/ou dans des modèles animaux, moduler le comportement alimentaire ou l'état émotionnel ou la mémoire. Néanmoins, aucune étude n'a testé l'effet direct du fructose sur l'activité de neurones ou autres cellules du cerveau (microglie). Ainsi, le but de ce projet est de déterminer si le fructose joue le rôle de molécule signal au niveau cérébral, module l'activité de neurones ou de microglies et participe au contrôle des émotions. Pour cela, nous déterminerons par

immunohistochimie si l'administration (orale ou intrapéritonéale) de fructose active des régions cérébrales et lesquelles; et si l'alimentation de souris avec du fructose (dans l'eau de boisson ou avec des croquettes enrichies en fructose) favorise une inflammation cérébrale et altère les émotions grâce à l'utilisation de tests comportementaux spécifiques. L'ensemble des expériences sera réalisé sur des souris sauvages contrôles ou déficientes pour le transporteur de fructose GLUT5.

Ce projet de trois ans sera réalisé sur 1080 souris mâles adultes. L'étude de comportements anxio-dépressifs et l'effet d'une alimentation enrichie en fructose 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 (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement, application d'antalgique) des animaux.

16049 Le Syndrome de Down (SD) ou Trisomie 21 (T21) est la première cause de retard mental d'origine génétique. Le SD est lié à la présence d'une copie supplémentaire du chromosome 21 et touche 1 naissance sur 600 à 800. Il se caractérise par des déficiences intellectuelles : les personnes atteintes de SD ayant des difficultés d'apprentissage et de mémorisation qui sont liées à des défauts dans le développement et le fonctionnement du cerveau. L'amélioration des soins apportés aux personnes atteintes du SD a permis d'augmenter considérablement leur espérance de vie. Cette augmentation a mis en évidence chez ces personnes un risque accru de développer, de façon précoce, une maladie d'Alzheimer (MA). En effet, il a été constaté que près de 100% des personnes atteintes de SD présentent les caractéristiques de la MA à 40 ans. Cependant, les mécanismes impliqués dans le développement d'une MA dans un contexte de trisomie ne sont pas connus.

Nous avons ainsi créé de nouveaux modèles de rat trisomiques qui se veulent plus proche des conditions observées dans la pathologie humaine et qui pourraient donc nous permettre d'étudier ces mécanismes. Nous souhaitons maintenant étudier ces modèles d'un point de vue comportemental dans un premier temps, au travers de différents tests permettant d'évaluer l'activité circadienne, la locomotion dans un nouvel environnement ainsi que l'apprentissage et la mémoire (avec un minimum de 24h entre chaque test). Par la suite, nous souhaitons étudier la structure de la rétine afin de mettre en évidence de potentielles anomalies oculaires dans nos modèles rats, les patients atteints du SD présentant des troubles oculaires. Enfin, des analyses moléculaires et histologiques seront réalisées. Dans le cadre des analyses moléculaires, nous souhaitons notamment réaliser des prélèvements sanguins. Cela nous permettra de réaliser différentes analyses avec, entre autres, une étude de marqueurs d'inflammation et de marqueurs caractéristiques de la MA qui sont présent dans le sang. En effet, une augmentation de l'expression de certains marqueurs inflammatoires peut être observée chez les personnes atteintes du SD, cette augmentation étant plus importante chez les personnes atteintes du SD avec une démence. Ces prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale afin de limiter le stress pour l'animal. Enfin, en ce qui concerne les analyses histologiques, elles nécessitent la réalisation d'une perfusion de l'animal, procédure réalisée sous anesthésie générale afin qu'aucune douleur ne soit générée. Il s'agit de la seule technique nous permettant d'être dans des conditions optimales pour les études que nous souhaitons réaliser par la suite.

Réduction : Tenant compte du principe de réduction, nous utiliserons un nombre minimal d'animaux (256) estimé pour avoir des résultats scientifiquement interprétables. Dans le but d'utiliser l'ensemble des animaux produits et de prendre en compte une éventuelle dysmorphie sexuelle, nous utiliserons des mâles et des femelles.

Raffinement : L'ensemble des tests qui seront réalisés entraîne très peu de stress ou de souffrance pour les animaux. De plus, une phase d'habituation à l'expérimentateur sera réalisée à raison d'une manipulation par jour pendant 5 jours la semaine précédant le début des tests. Par ailleurs, les procédures de prélèvements sanguins et de perfusion sont réalisées sous anesthésie générale afin de ne générer aucun stress et douleur.

Les animaux seront hébergés par 2 et disposeront d'un bâton à ronger comme enrichissement. Ils feront l'objet d'un suivi quotidien permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Différentes pathologies peuvent apparaître chez ces animaux d'autant plus que du vieillissement sera réalisé (fin

des tests à 13-14 mois), il n'est pas possible d'anticiper ce que les animaux pourraient développer. Selon la pathologie et l'état de l'animal, un traitement adapté sera mis en place, s'il n'interfère pas avec les analyses comportementales, et ce en concertation avec le vétérinaire. Dans le cas contraire, l'animal sera mis à mort. Il sera donc nécessaire d'adapter le traitement au cas par cas.

Remplacement : Il n'existe à l'heure actuelle pas d'alternative à l'utilisation des animaux pour les études concernant le cerveau. En effet, l'étude de déficits cognitifs nécessite un modèle vivant et suffisamment proche de l'Homme pour pouvoir être transposée à l'espèce humaine.

16050 L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est la forme la plus commune d'épilepsie chez l'adulte, touchant près d'1% de la population des pays occidentaux dans les années 2000. Elle se caractérise par la survenue de crises d'épilepsie récurrentes et imprévisibles, souvent générées par l'hippocampe. La maladie se manifeste également par des troubles persistants des fonctions cognitives et émotionnelles, des fonctions qui impliquent normalement l'hippocampe. En outre, près d'un tiers des patients souffrants de cette maladie sont résistants aux traitements pharmacologiques traditionnels. Un traitement chirurgical, consistant à retirer ou isoler le foyer épileptique, apparaît dans ce cas comme l'ultime recours. Cependant, cette option n'est pas toujours possible pour tous les malades pharmaco-résistants, et la chirurgie ne garantit pas toujours la disparition des crises. De plus elle n'est pas sans risque pour les facultés cognitives. C'est pourquoi l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'épilepsie du lobe temporal est un enjeu clinique majeur. Un tel traitement devrait corriger des mécanismes déficients dans le contexte de l'ELT. Chez l'humain, les causes de l'ELT ne sont généralement pas identifiées avec certitude. Selon l'hypothèse la plus couramment acceptée, un traumatisme initial (qui pourrait être dû à une méningite, un traumatisme crânien, ou encore une tumeur) provoquerait une réorganisation du réseau neuronal de l'hippocampe, lequel devient hyperexcitable et susceptible de générer des crises d'épilepsie. Afin d'étudier les mécanismes conduisant à l'hyperexcitabilité de l'hippocampe, des modèles de rongeurs ont été développés. Chez ces modèles, le traumatisme initial peut être reproduit par l'injection d'agents pharmacologiques tels que la pilocarpine. De manière similaire à ce qui se passe chez l'humain, des crises d'épilepsie spontanées et récurrentes, souvent générées par l'hippocampe, apparaissent chez les animaux traités après une période de latence. De même, ces animaux présentent des défauts comportementaux comparables à ceux que l'on retrouve chez l'humain.

En nous basant sur le modèle pilocarpine de souris, nous nous intéressons à une sous-population d'interneurones GABAergiques de l'hippocampe dans des conditions d'ELT. Ces interneurones étant « inhibiteurs », leur dysfonctionnement pourrait constituer un mécanisme « détonateur » des crises d'épilepsies. En outre, ces neurones jouent normalement un rôle de « chef d'orchestre » des activités neuronales qui encoderaient pour les fonctions cognitives. L'altération de leur propriété pourrait donc interférer avec les processus fonctionnels assurés par l'hippocampe. Dans ce projet, nous proposons d'étudier, puis de restaurer, les altérations des propriétés électrophysiologiques des interneurones de l'hippocampe dans le but de réduire les crises d'épilepsie et de rétablir le comportement normal des souris.

Nous prévoyons d'utiliser 576 souris (*Mus Musculus*) sur une période de 5 ans. Pour une partie de nos expériences, l'utilisation de souris vivantes et en comportement libre est nécessaire car nous souhaitons réduire les symptômes *in vivo* liés à l'épilepsie (crises d'épilepsie, troubles cognitifs et de l'humeur). En revanche, nos protocoles ont été conçus dans l'esprit des points réduction et raffinement de la règle des 3R. Nous utiliserons des mâles de 2 mois environ, dont le taux de survie et d'induction pharmacologique de l'épilepsie est le plus élevé. Nous avons établi un protocole qui limite au maximum la souffrance et la mortalité des animaux ; les souris seront minutieusement observées à chaque étape des procédures selon une grille de critère associée à une conduite à tenir précise (injection de caféine, d'analgésique et d'anti-inflammatoires appropriés, etc.). Enfin tout est mis en œuvre pour réduire le stress des animaux au minimum ; les souris sont habituées progressivement aux expérimentateurs et aux salles d'expérimentation, et elles sont maintenues dans un hébergement enrichi (bâtonnets de bois, maison et/ou tunnel en carton, matériel pour le nid).

En conclusion, le projet est de caractériser les propriétés de sous-types d'interneurones de l'hippocampe dans des conditions d'ELT. Cette étude sera réalisée *ex vivo* sur des tranches de

cerveaux de souris contrôle ou épileptiques, et *in vivo* sur des souris en comportement, ou bien enregistrées grâce à un dispositif d'électroencéphalogramme télémétrique, avant ou après manipulation génétique ou pharmacologique d'une sous-population génétiquement définie d'interneurones.

16051 La torsion testiculaire est une pathologie due à une torsion du cordon spermatique conduisant à l'arrêt brutal de la circulation dans le testicule. Il s'agit d'une urgence urologique chirurgicale puisque dès six heures d'ischémie, les lésions irréversibles apparaissent. La détorsion chirurgicale au bloc opératoire et la reperfusion sanguine qui en découle entraînent la formation de lésions dites d'ischémie-reperfusion, générant un stress oxydatif délétère sur l'organe déjà lésé par l'ischémie. Ces lésions spécifiques sont retrouvées lors des transplantations d'organe de façon quasi-systématique.

L'objectif du projet est d'étudier dans un modèle établi de torsion testiculaire chez le rat l'influence de la manipulation de l'oxygénation sur l'apparition et la sévérité des lésions d'ischémie-reperfusion. Ces lésions ne sont observables que sur des modèles animaux vivants, seul état par définition à permettre l'observation des lésions d'ischémie-reperfusion. Il n'existe à ce jour pas de méthode alternative ou complémentaire permettant d'observer ce type de lésions. Le rat a été choisi car sa physiologie vasculaire est similaire à celle de l'homme et bien documentée dans la littérature. Dans le respect de la règle des 3R, 50 rats au total intégreront l'étude, ce nombre ayant été défini en s'appuyant sur des tests statistiques. Après une semaine d'acclimatation et de sociabilisation par des manipulations douces, les rats évolueront dans une grande cage pourvue d'une litière de copeaux en couche épaisse enrichie de plateformes ou de tunnels en plastique. Pour exposer les rats à une baisse de la concentration en oxygène dans l'atmosphère (hypoxie), ils seront placés dans leur cage dans une enceinte vitrée permettant leur observation continue. Afin d'observer l'apparition des lésions d'ischémie-reperfusion, une ligature du cordon spermatique sera réalisée sous anesthésie gazeuse et sous analgésie. A l'issue de la chirurgie, les rats seront replacés dans leur cage, en groupe, et des dispositions particulières seront prises (notamment, persistance après la chirurgie de l'utilisation de matelas chauffants pour lutter contre l'hypothermie post-opératoire). Les animaux seront observés en continu pendant l'étude et leur état sera évalué grâce à une grille de suivi et de douleur adaptée (basée sur l'échelle de Morton et Griffith). A la fin du protocole, les rats seront euthanasiés après anesthésie gazeuse et les différents prélèvements biologiques seront recueillis pour analyses ultérieures.

16052 1-Objectif pédagogique du projet: Proposer aux étudiants une approche intégrée de la neurophysiologie comportant une étude comportementale, puis des analyses biochimiques, histologiques, immuno-histologiques et de biologie moléculaire permettant de comprendre l'origine des défauts phénotypiques observés.

2- Retombées attendues: Premier contact avec le "modèle souris" pour des étudiants se destinant pour la plupart à la recherche scientifique, sensibilisation à l'éthique, acquisition de nombreuses techniques expérimentales et de connaissances liées à l'étude du système nerveux central.

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

Le remplacement des animaux utilisés ici n'est pas possible puisqu'ils sont destinés à former les étudiants à l'utilisation de modèles expérimentaux, notamment à la réalisation de tests comportementaux. Le nombre d'animaux est réduit au minimum tout au long de l'année, de manière à ce que lors de la semaine de TPs, chaque groupe d'étudiants puisse disposer d'une souris de chaque lignée (plus une souris contrôle). Si des animaux surnuméraires sont produits, ils sont utilisés pour confectionner des coupes histologiques qui serviront au cours des TPs des années suivantes. En matière de raffinement, pendant leurs 2 mois d'élevage, le soin apporté aux souris shiverer homozygotes, particulièrement sensibles, est assuré par des personnes expérimentées dans le "maniement" de cette lignée. De même, leur transfert vers les salles de TP est réalisé de manière à éviter autant que faire se peut tout stress (notamment acoustique) aux animaux. Avant la réalisation des tests comportementaux par les étudiants, ceux-ci auront été formés à l'éthique et avertis des conditions de manipulation des animaux. Pendant les procédures expérimentales à proprement parler, une surveillance accrue est exercée sur le comportement des animaux, en particulier après les éventuelles chutes effectuées par certains d'entre eux lors des tests du pont ou du Rotarod. On vérifie

alors que les souris ont un comportement normal après leur retour dans leur cage (ce qui jusqu'à présent a toujours été le cas depuis l'origine de ces TPs). Les points limites pendant ou après les procédures expérimentales sont les mêmes que ceux décrits en 3.4.13.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

le nombre maximum de souris utilisées dans le cadre de ce projet de travaux pratiques est de 66 souris par an; soit 132 souris au total.

16053 L'insuffisance cardiaque est une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés et constitue donc un enjeu important en termes de santé publique. Elle se traduit par l'incapacité du cœur à assurer sa fonction principale qui consiste à faire circuler le sang dans l'organisme. Cette fonction de pompe étant assurée par des cellules contractiles, à savoir les cardiomyocytes, au niveau tissulaire, l'insuffisance cardiaque se caractérise par la mort de ces cellules. Cette mort peut être provoquée sous l'action des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Il s'agit de dérivés de l'oxygène capables d'infliger aux protéines et à l'ADN des dommages susceptibles de perturber gravement le fonctionnement des cellules. Pour faire face à ce stress oxydant, la cellule dispose de systèmes antioxydants. Parmi eux, le système de la thiorédoxine (Trx) joue un rôle important. La Trx est une enzyme existant sous plusieurs formes dont la Trx-1, la Trx-2 et la Trx-80, forme tronquée de la Trx-1. Il a été montré que la Trx-1 joue un rôle cardioprotecteur dans les modèles murins.

Le but de notre projet est d'étudier le rôle de ces différentes formes de Trx sur la capacité de prolifération des cardiomyocytes. Pour réaliser cette étude, nous utiliserons des virus adéno-associés (AAV). Il s'agit de virus capables d'infecter les cellules dans le but d'obtenir une augmentation des niveaux d'expression des différentes formes de Trx humaines. De plus, une molécule de synthèse mimant l'action de la Trx-1 sera utilisée. Nous évaluerons ainsi l'effet de ces protéines sur des cœurs ayant subi un infarctus. Le modèle animal choisi pour ce projet est une souris C57BL/6Rj sur laquelle a été pratiquée une intervention destinée à provoquer les effets d'un infarctus du myocarde.

Toutes les procédures de ce projet sont conçues en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale : remplacement, réduction et raffinement. Dans notre cas, le modèle animal est fondamental : en effet, l'étude de l'insuffisance cardiaque ne peut se faire que sur un organisme vivant entier afin de se rapprocher le plus possible de la pathologie humaine. Grâce à une planification minutieuse, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. L'insuffisance cardiaque sera induite chez la souris en respectant au maximum les procédures en faveur du bien-être animal et en limitant la souffrance par des méthodes anesthésiques et analgésiques adéquates. Les animaux seront surveillés quotidiennement tout le long de l'expérimentation afin de détecter des signes éventuels de mal-être ou de douleur. Pour chaque condition testée, ce projet nécessite trois groupes de souris : un premier groupe subira une thoracotomie (incision de la paroi thoracique) sans occlusion coronaire (groupe Sham) avec injection d'AAV, un deuxième groupe subira un infarctus par ligature de l'artère coronaire sans injection d'AAV (groupe contrôle) et un troisième groupe subira un infarctus par ligature de l'artère coronaire avec injection d'AAV par voie intraveineuse. Chaque expérience sera répétée 3 fois afin d'obtenir des résultats statistiquement probants. Pour atteindre ce but, nous avons calculé au moyen d'une approche statistique que 396 souris seront nécessaires pour cette étude.

16054 La cardiomyopathie dilatée est la plus fréquente des cardiomyopathies et dans 30 à 40% des cas, elle a une origine génétique. Parmi les formes familiales, celles liées aux mutations du gène LMNA sont parmi les plus fréquentes, mais sont surtout les plus agressives avec un très fort taux de décès par mort subite. Plus de 400 mutations différentes du gène LMNA ont été rapportées conduisant à des dilatations cardiaques, associées ou non à des atteintes des muscles squelettiques, comme dans la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD). Une seule copie du gène muté suffit au développement de la pathologie. A l'heure actuelle, aucun traitement curatif n'existe, et seule l'implantation d'un défibrillateur cardiaque permet de retarder l'échéance de la transplantation cardiaque.

Dans ce contexte, le présent projet vise à tester l'efficacité d'une approche de thérapie génique permettant de réduire de manière l'expression de la protéine mutée en induisant la dégradation

spécifique de l'ARN messager muté par shRNA. Cette spécificité vient du fait que le shRNA cible une zone unique à l'ARN muté; dans notre cas une variation non pathogénique de la séquence ARN. La validation des meilleures séquences du shRNA est en cours de validation *in vitro* sur des cellules de patients ainsi que sur des cellules musculaires issues de notre modèle murin de la pathologie. Afin d'aller plus loin dans la validation de cette approche, une étude *in vivo* est nécessaire.

Notre modèle murin sont les souris portant la mutation LMNA H222P identifiée chez des patients EDMD croisées avec des souris CAST/EiJ afin d'introduire une variation non pathogénique à l'état hétérozygote au niveau de l'ARN LMNA. Ces souris ne présentent aucun phénotype dommageable puisque la mutation doit être à l'état homozygote chez la souris pour entraîner le développement d'un phénotype cardiaque et musculaire.

Afin de tester notre approche thérapeutique, 3 constructions différentes seront testées. Deux shRNA entraînant la dégradation de l'ARN LMNA, soit WT (sh-G) soit muté (sh-C) et 1 shRNA contrôle (shScramble). Ces constructions seront intégrées dans des vecteurs adénoviraux (AAV) de sérotype 9, correspondant au sérotype ayant le meilleur taux de transduction dans les muscles squelettiques et le cœur. Un AAV contrôle sera également utilisé, ne codant pour aucun shRNA et appelé AAV-vide. Toutes ses constructions possèdent également un gène rapporteur fluorescent GFP permettant de suivre l'efficacité de l'injection et de la diffusion de l'AAV dans l'organisme et plus particulièrement dans le cœur. Ces AAVs seront injectés par voie intraveineuse dans la veine de la queue d'animaux de 3-4 semaines, permettant une diffusion dans tout l'organisme et une bonne transduction du cœur.

Aucun phénotype n'est attendu chez les souris qui auront reçu les constructions sh-C, shScramble et vide. En revanche, si le sh-G est efficace, les souris injectées auront une réduction de l'expression des protéines codées par le gène LMNA sauvage, mais le maintien de l'expression de la protéine mutée, ce qui devrait entraîner un phénotype cardiaque: trouble du rythme et dilatation cardiaque.

- Une étude à court terme sur 3 souris mâles par construction (soit 12 souris) nous servirons de preuve de principe de l'efficacité des constructions d'un point de vue moléculaire.

- Si ces études préliminaires montrent une efficacité des shRNA, nous réaliserons une étude à long terme sur 6 souris mâles par construction (soit 24 souris). Les animaux seront suivis en échocardiographie et électrocardiographie tous les 2 mois depuis l'âge de 2 mois). A huit mois, les animaux seront sacrifiés afin de réaliser les études biologiques et biochimiques.

- Etant donné la différence phénotypique liée au sexe de notre modèle animal, le même protocole sera également appliqué aux souris femelles: 3 souris par construction pour l'étude à court terme (soit 12 souris) et en fonction des résultats de cette étude à court terme, 6 autres souris femelles par construction seront injectées pour l'étude à long terme (soit 24 souris), avec un sacrifice des souris à l'âge de 12 mois.

Ainsi pour la réalisation de ce projet, un maximum de 72 souris sera nécessaire.

Remplacement: Le recours à un est indispensable pour étudier la complexité de la diffusion des AAV et du développement du phénotype cardiaque. Contrairement à d'autres modèles animaux, la souris a l'avantage d'être relativement proche de l'homme sur le plan génétique pour avoir un modèle reconnu de la pathologie humaine. D'autre part, les souris constituent un modèle animal dans lequel nous avons du recul sur l'utilisation et la diffusion des AAV.

Réduction: Le projet en plusieurs étapes (protocole court et protocole long) permettra éventuellement de réduire le nombre de souris utilisées si les résultats du protocole court montrent l'inefficacité du traitement.

Raffinement: Les personnes en charge du projet sont expérimentées pour les injections intraveineuses. Les animaux injectés seront suivis quotidiennement par les personnes en charge du projet ou par le personnel de l'animalerie. Les souris seront euthanasiées si elles présentent des signes de souffrance. D'autre part, le suivi par échocardiographie et électrocardiographie permettra éventuellement de sacrifier avant l'âge de 8 mois (ou 12 mois pour les femelles), des animaux présentant un phénotype cardiaque trop dommageable.

16055 Les maladies auto-immunes sont des maladies qui ont pour origine une dysrégulation de notre système immunitaire. Elles peuvent se présenter sous différentes formes, et atteindre l'ensemble des organes. L'incidence de ces maladies est en plein essor ces dernières décennies. Ainsi, connaître le mécanisme de dysrégulation pour traiter voire prévenir ce type de maladie est un enjeu important.

Récemment, une population cellulaire appelée lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfr) a été découverte. Son rôle est de contrôler l'activation d'autres cellules appelées T folliculaires helper (Tfh) qui contribuent à la production d'anticorps, y compris des auto-anticorps responsables de maladies auto-immunes. Ainsi, mieux connaître le mécanisme de régulation des Tfh par les Tfr devrait avoir des implications thérapeutiques importantes.

Notre laboratoire a récemment montré qu'une molécule appelée interleukine-1 (IL-1) serait impliquée dans l'activation des Tfh et que les Tfr contrôlèrent les Tfh en bloquant cette molécule du fait de l'expression de 2 récepteurs inhibiteurs de l'IL-1, IL-1Ra et IL-1R2. Nous pensons donc que ces récepteurs sont impliqués de façon majeure dans cette régulation. Nous proposons d'étudier leur rôle dans le contrôle des Tfh par les Tfr en utilisant des modèles de souris ayant des déficiences ciblées de ces récepteurs à l'IL-1 sur les Tfh et Tfr. Nous testerons la fonctionnalité des Tfh et Tfr dans ces modèles, notamment pour la production d'anticorps. Nos travaux devraient permettre de mieux comprendre la régulation des réponses immunitaires par anticorps et de trouver de nouvelles thérapeutiques des maladies auto-immunes.

Trois axes seront développés visant à (i) confirmer les différents KO, (ii) observer le retentissement de ces KO dans la réponse humorale physiologique, (iii) observer le retentissement de ces KO dans la réponse humorale pathologique.

1) Remplacer : La souris est un modèle validé en immunologie et particulièrement dans les études visant à mieux décrire les mécanismes modulant la réponse immunitaire. Aucune alternative à l'utilisation d'un modèle murin n'est disponible pour cette recherche.

2) Réduire : Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur le principe de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Nous utiliserons au total 1500 souris C57BL/6. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal et tenant compte de l'effectif minimal pour atteindre une puissance statistique suffisante (Calculée avec G*Power). Par exemple, seuls les stratégies validées précédemment par notre équipe chez des souris non génétiquement modifiées seront ici (et déjà testées préalablement *in vitro*). Des études exploratoires sur un petit nombre de souris seront réalisées pour sélectionner les meilleures stratégies avant d'évaluer leur impact sur un nombre plus important d'animaux. Nous remplacerons (règle des 3R) toujours les expériences chez l'animal par des tests *in vitro*, si cela est possible. Par exemple, l'étude des mécanismes d'activation/Suppression des Tfr et des Tfh pourront en grande partie être abordés par des tests *in vitro*.

3) Raffiner : Par ailleurs, nous veillerons systématiquement à diminuer les contraintes et la douleur qui peuvent être liées à la mise en œuvre expérimentale, notamment par une période d'habituation systématique avant expérimentation, un hébergement amélioré, des points d'arrêt anticipés et le recours à des anesthésie et analgésie pour limiter la douleur.

16056 La proportion de personnes présentant une surcharge en graisse dans le foie est en progression constante dans les pays occidentaux. Chez certaines de ces personnes, la surcharge en graisse s'accompagne d'inflammation. Cet état inflammatoire peut entraîner une fibrose (une accumulation anormale de protéine dans le foie, qui entraîne une souffrance cellulaire), une cirrhose (une étape plus grave de la fibrose où le foie ne fonctionne plus correctement) voire une tumeur. Une modification de la composition des muscles est également retrouvée chez ces patients (perte de volume, surcharge en graisse). Pour une prise en charge adéquate, il est donc important de distinguer les patients présentant simplement une surcharge en graisse de ceux présentant une surcharge en graisse avec inflammation. Aucune méthode d'imagerie existe actuellement pour ce diagnostic.

Ce projet s'attache à développer et valider des techniques avancées d'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour pallier ce manque. Afin de recréer la pathologie humaine chez l'animal, des

souris ne ressentant pas de sentiment de satiété recevront un régime riche en graisse. Ce modèle provoque une inflammation du foie en seulement 8 semaines, avec apparition d'une fibrose importante au bout de 34 semaines. Pour étudier un modèle où l'inflammation apparaît plus lentement et progressivement, des souris normales recevront un régime riche en graisse, sucre et cholestérol pendant 34 semaines également. Les animaux seront suivis par IRM à différents temps pendant l'administration du régime. La session se déroulera sous anesthésie gazeuse, avec vérification du rythme respiratoire et maintien de la température corporelle. Des techniques d'IRM pouvant évaluer les différents éléments de la pathologie seront testées dans le foie et dans le muscle, en particulier pour évaluer la fibrose, l'inflammation, la souffrance cellulaire et les compartiments lipidiques. Tout d'abord, une étude sera menée quand l'inflammation s'établit (144 animaux) et quand la fibrose s'établit (144 animaux) pour identifier les techniques capables de détecter l'inflammation, même en présence de fibrose. Ensuite, les techniques pouvant détecter l'inflammation seront utilisées pour un suivi pendant la progression de la maladie (80 animaux). A la fin du suivi IRM, les animaux seront euthanasiés pour prélèvements sanguins et tissulaires. De nombreux paramètres d'imagerie seront calculés à chaque session, renseignant sur la composition et la structure du tissu, la fibrose, la surcharge en graisse, l'inflammation et la souffrance cellulaire, dans le foie et le muscle.

368 souris seront utilisées au cours de ce projet de 3 ans. Le projet respectera la règle des 3R. Le modèle animal ne peut pas être remplacé ici, car il permet d'explorer les interactions entre le foie et le muscle qui sont spécifiques de la pathologie étudiée (surcharge en graisse avec inflammation). Le nombre d'animaux par groupe a été choisi suite à des études préliminaires. Le nombre de groupes a été limité grâce à l'IRM, qui permet de mesurer en une seule session différents paramètres caractérisant tous les aspects de la pathologie, à la fois sur le muscle et le foie. De plus, cette technique non-invasive permet le suivi longitudinal des animaux. Les échantillons sanguins et tissulaires récupérés en fin d'expérience seront analysés ou conservés dans une biobanque locale. Les techniques d'imagerie seront développées et optimisées sur des matériaux avant leur application sur les animaux. La souffrance des animaux est minimale car nous n'atteignons jamais le point où le foie ne fonctionne plus correctement (cirrhose) et bien avant l'apparition de tumeur. Les sessions d'IRM sous anesthésie et avec monitoring constant n'occasionnent aucune douleur ou angoisse chez les souris. Des points-limites généraux et spécifiques ont été définis pour évaluer la souffrance animale. Les animaux seront surveillés quotidiennement ; si les points-limites sont atteints, l'animal sera euthanasié.

16057 L'émergence des nouvelles technologies utilisant les radiofréquences (RF) (300 MHz-300 GHz) a pris une grande importance car nous sommes inévitablement exposés à ces champs électromagnétiques et la question se pose des effets potentiels sur la santé et des normes internationales d'exposition.

Etant donné de multiples paramètres susceptibles d'être modifiés, la réponse immunitaire au cours d'une infection parasitaire chez la souris constitue un modèle biologique de choix pour l'étude de l'effet de ces ondes sur la santé. Notre projet a pour but de déterminer si des ondes RF à 2,45 GHz, de type hélicoïdal, ondes de plus en plus employées pour les communications sans fil, sont capables de modifier la réponse immunitaire chez la souris infestée avec des trypanosomes.

Les animaux, libres de leurs mouvements, seront exposés corps-entier à ce type d'ondes à différents niveaux de puissance correspondant aux limites d'exposition pour le public (0,08 W/kg), pour les professionnels (0,4 W/kg) et au niveau critique à partir duquel un échauffement des tissus est observé (4 W/kg).

Pour ce projet, le nombre de souris Swiss femelles est estimé à 160 sur 3 ans, 80 exposées et 80 non exposées par groupes de 10 souris (5 exposées aux RF et 5 non-exposées en duplicata) et 130 souris pour entretenir la souche parasitaire.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

Réduire : Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux qui nous permettra de réaliser tous les tests, soit 16 groupes de 10 souris par niveau d'exposition pour l'identification de la dose la plus active, plus 130 souris pour entretenir la souche parasitaire et donc un total de 290 souris.

L'analyse statistique utilisée sera le test de Kruskal Wallis.

Raffiner : Les souris seront placées dans des cages standard en plexiglass d'au moins 800 cm², utilisées dans l'animalerie, avec 5 souris par cage. Les souris seront exposées aux RF dans ces mêmes cages, ce qui supprimera la manipulation et évitera donc de les stresser. Elles bénéficieront d'un enrichissement avec une hutte en polycarbonate rouge, ainsi que du matériel de nidification. Les conditions d'hébergement dans l'animalerie sont de 22±2°C, 55±5% d'humidité et un cycle jour-nuit (8 heures-20 heures). La salle dans laquelle seront exposés les animaux présente également une ambiance contrôlée. Une surveillance quotidienne sera assurée par le personnel de l'équipe au cours de laquelle sont vérifiés :

- L'apparence physique externe, par exemple l'absence de signes d'agression (sang, morsure, lésions de la peau), les caractéristiques de la fourrure, qui doit être lisse et propre (blanche)
- Les changements du comportement et de l'interaction avec les partenaires, par exemple l'agitation, la prostration, etc.
- Les réponses comportementales aux stimuli externes, par exemple, la réaction au bruit, l'émission de cris anormaux
- De plus, la variation du poids de l'animal sera surveillée avec une pesée quotidienne si les souris présentent des signes de souffrance.

Des femelles seront utilisées, permettant ainsi d'éviter l'agressivité entre des groupes de mâles

Remplacer : Remplacer le modèle animal n'est pas possible pour ce projet qui étudie des processus dynamiques du système immunitaire qui ne peuvent pas être recréés sur des modèles *in vitro*.

Ainsi, l'évolution d'une parasitose ne peut être étudiée que sur un modèle animal et ne peut être remplacée en aucun cas par d'autres méthodes alternatives expérimentales : *in vitro*, peu de parasites survivent, et les conditions de culture des parasites, modifiant la majorité de leurs propriétés, ne sont pas satisfaisantes pour atteindre les objectifs requis. Il n'y a pas de substitution possible au modèle animal.

16058 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 du ligand fonctionnel de Fpr1, Anxa1. 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 en utilisant des souris immunocompétentes (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.

16059 Les études de toxicologie par administration unique ou répétée sont réglementairement requises par les lignes directrices ICH (International Committee of Harmonization) /EMA pour les médicaments humains et vétérinaires, OCDE/Reach pour la chimie et ISO10993 pour les dispositifs médicaux. Ces études sont des pré-requis aux essais cliniques de phase I, II ou III. Elles visent à définir le profil de toxicité des produits à tester et donc orienter le suivi clinique des volontaires sains et patients incorporés dans les essais cliniques. Elles ont également pour objectif de définir le niveau de dose (marge de sécurité) pour la première administration à l'homme ou l'animal. Ces études incluent des évaluations toxico-cinétiques pour déterminer les taux d'exposition entraînant une toxicité. La durée des études de toxicologie varie en fonction du stade de développement du produit à tester et de sa posologie.

Pour la chimie, ces études permettent de constituer des fiches de données de sécurité pour la protection des utilisateurs et des travailleurs.

Les études de toxicologie sont réalisées sur les espèces suivantes : rat, souris, cobaye, hamster, lapin, chien.

Compte-tenu du nombre d'études réalisées et demandées pendant les années précédentes, le nombre d'animaux maximum pour le présent projet (5 ans) est de :

30 000 pour les rats, 30 000 pour les souris, 1 000 pour les lapins, 2 000 pour les chiens, 500 pour les cobayes et 200 pour les hamsters.

Le nombre d'animaux par groupe étant fixé par les lignes directrices ICH/EMA, OCDE ou norme ISO10993, les études de toxicologie appliquent cependant autant que possible la règle des 3Rs.

- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum en accord avec les lignes directrices.
- les animaux sont hébergés en groupe avec un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger, incitation au fouissement ...) conformément à la directive européenne 2010/63/EU.
- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études.

Les études de toxicologie peuvent entraîner des signes d'inconfort ou d'intolérance voir la mort de l'animal en particulier à la dose la plus forte.

Pour quantifier cela, les animaux sont observés quotidiennement. Différents paramètres sont pris en compte tels que le comportement de l'animal, les signes cliniques observés, la perte de poids, une modification de la température corporelle, des changements au niveau de la consommation hydrique ou alimentaire. Suivant les observations, une décision est prise par le vétérinaire en concertation avec le responsable de projet, qui peut-être la mise en place d'un traitement, l'arrêt du traitement par le produit à tester et en cas extrême, en accord avec les points limites établis pour tout type d'étude, la mise à mort de l'animal. Ces points sont les suivants :

- Amaigrissement marqué >20%
- Baisse de la température corporelle (< 35°C chez le chien, < 34°C chez les rongeurs...)
- Résultats anormaux au niveau des paramètres hémato-biochimiques représentant un danger pour la vie
- Signes sévères de douleur ou de détresse

Sur la base des mesures et processus mis en place pour anticiper douleur ou détresse comme décrit plus haut, ce projet est classé avec un degré de sévérité modéré.

16060 Le projet consiste à réaliser un suivi des populations piscicoles en milieu estuarien et plus particulièrement de la population soutenue d'esturgeons européens *Acipenser sturio*. En effet, cette espèce est en danger critique d'extinction. Des programmes européens ainsi qu'un plan national d'action en faveur de la restauration de l'espèce ont permis, depuis plusieurs années, de maîtriser la reproduction en captivité de ces poissons et de lâcher dans le milieu naturel des juvéniles issus de ces reproductions, pour soutenir la population sauvage. Afin de connaître l'évolution, dans son milieu naturel, de cette population soutenue et d'évaluer le succès de ces pratiques de repeuplement, un suivi régulier doit être mis en place. Nous proposons de le réaliser dans le milieu estuarien où les individus vont séjourner plusieurs années avant de partir grossir en mer. Ainsi, une fois tous les 2 mois, soit 6

fois par an, un échantillonnage piscicole par la méthode de pêche au chalut de fond sera réalisé dans des secteurs estuariens adjacents aux fleuves dans lesquels les juvéniles ont été déversés. Il s'agira de recapturer ces individus pour estimer l'évolution de leur abondance et de connaître également les autres populations de poissons présentes pour identifier les interactions possibles. A chaque campagne d'échantillonnage, le filet sera mis à l'eau 21 fois (= 21 traits de chalut, un dans chacune des zones repérées comme permettant la pratique du chalutage). Chaque trait dure en moyenne 30 minutes.

A chaque remontée du chalut, les poissons seront identifiés. 30 individus par espèce seront mesurés tandis que les autres seront seulement dénombrés et remis très rapidement à l'eau. Toutefois, s'il s'agit d'esturgeons européens, la longueur, le poids, l'état général de chaque individu et le numéro de leur marque s'ils en sont dotés, seront renseignés. S'ils ne sont pas encore marqués, on leur implantera une marque interne (Pit-tag= petite puce électronique au numéro unique qui est placée dans le muscle dorsal), et une marque externe numérotée. On prélèvera de petits morceaux de nageoire pour réaliser plusieurs analyses a posteriori : analyse génétique qui permettra de savoir d'où les individus proviennent (sauvages ou issus des actions de repeuplement) ; analyse de la composition chimique pour retracer leur utilisation des habitats et l'origine de leurs proies ; estimation de leur âge. Afin de connaître leur régime alimentaire, des lavages gastriques seront effectués sur certains individus. Selon leur taille, un dispositif externe enregistrant les paramètres du milieu (température, oxygène, salinité) sera fixé sur leur dos pour connaître leurs préférences environnementales. Pour les plus gros d'entre eux, une marque satellite sera fixée à la base de la nageoire caudale pour retracer leur trajectoire une fois qu'ils auront atteint l'océan. Une échographie (état de maturité, sexage) et une photographie (morphologie générale) seront également réalisées.

Nous avons veillé au respect de la règle des 3 « R » :

- aucun remplacement des poissons étudiés ne peut être effectué puisque les données recherchées ne peuvent être fournies que par les espèces elles-mêmes vivant dans le milieu naturel.
- La durée du trait de chalut est réduite à 30 minutes pour limiter l'impact de la pratique de pêche sur le fond sous-marin, le stress pour les individus capturés et la quantité d'individus capturés au cours d'un trait, ce qui permet de les manipuler rapidement.
- Pour ce qui concerne le nombre de poissons qui seront manipulés, il faut considérer les esturgeons européens d'une part (une cinquantaine par an, soit environ 250 pour la durée totale du projet) et les autres espèces piscicoles d'autre part. Pour ces dernières, on devrait rencontrer, d'après les échantillonnages historiques : 2 espèces en quantité relativement importante (quelques milliers d'individus par an) qui sont le mulot porc et le maigre (soit environ 20 000 individus pour chacune de ces espèces pour la durée du projet). De manière régulière, à raison d'une centaine d'individus par an, des anguilles européennes, des bars francs, des bars mouchetés, des flets, des merlans, des soles, des sprats, des anchois, des gobies, des raies bouclées (soit 500 individus environ pour chacune de ces espèces sur les 5 années du projet). De manière occasionnelle et à hauteur d'une dizaine d'individus par an, des grandes aloses, des barbeaux fluviatiles, des motelles, des congres et des lamproies marines (soit environ 50 individus pour chacune de ces espèces pour la durée du projet). Enfin et de manière très occasionnelle puisque nous prévoyons moins de 2 individus par an, des lamproies fluviatiles ou des silures (soit 10 individus environ pour chacune de ces espèces pour la durée du projet). C'est parmi ces espèces qu'à chaque remontée du filet (ou « trait »), nous mesurerons jusqu'à 30 poissons par espèce. Ceux-là seront ensuite remis à l'eau, tandis que les autres auront été remis à l'eau immédiatement après la remontée du filet, après qu'ils aient été comptés. Ce nombre d'individus mesurés (30 par espèce) par trait de chalut constitue un compromis entre la démarche de réduction et les besoins statistiques pour estimer la structure en taille des populations. Au total, nous manipulerons au maximum 46 000 individus sur les 5 années du projet toutes espèces confondues.
- Une attention particulière est portée au raffinement. Ainsi, les espèces échantillonnées sont manipulées le plus rapidement possible avec des gants, en les maintenant humides ou immergées (viviers de stabulation) avant d'être relâchées dans le milieu naturel. Tous les poissons sont relâchés vivants. Si l'on constate des mortalités accidentelles lors de la pêche, le nombre de morts sera

comptabilisé et on évaluera les effets potentiels de nos pratiques sur les populations pour, le cas échéant, mettre en place des mesures adéquates si l'effet semble notable.

- Pour toutes les manipulations, les esturgeons européens sont anesthésiés. Toutes les manipulations, dont la pose des différentes marques, sont effectuées avec le plus grand soin, par des intervenants ayant une bonne expérience des différentes pratiques, dans le respect du bien-être animal et en toute conscience de la fragilité de cette espèce. A l'issue de ces manipulations, les poissons sont placés dans des bacs alimentés en eau de l'estuaire en continu jusqu'à leur réveil. Ils sont ensuite remis à l'eau à l'aide d'un toboggan seulement après qu'ils aient retrouvé un comportement de nage normal.

16061 L'étude des effets pharmacologiques d'un candidat médicament sur la fonction respiratoire vise à caractériser ses propriétés pharmacologiques sur les paramètres ventilatoires par la technique de la pléthysmographie corps entier. Ces études sont réalisées pour caractériser un effet bronchodilatateur (effet thérapeutique) ou rechercher les éventuelles propriétés de dépression respiratoire ou toute autre propriété entraînant une altération de la fonction respiratoire.

Le principe de cette technique consiste à placer l'animal dans une chambre de mesure (pléthysmographe) et d'enregistrer des variations de débit d'air dues aux mouvements de la cage thoracique pendant la respiration de l'animal. La fréquence respiratoire, les débits et temps d'inspiration et d'expiration, les résistances aériennes et le volume courant sont ainsi enregistrés par cette technique.

Ces études sont réalisées au bénéfice des patients incorporés dans les essais cliniques pour prévenir d'éventuels effets indésirables et/ou augmenter la probabilité de tester des candidats médicaments efficaces dans les essais cliniques.

Le rat et la souris sont les espèces les plus couramment utilisées dans la littérature scientifique pour l'étude de nouveaux candidats médicaments sur la fonction respiratoire. L'utilisation du cobaye est parfois requise.

Concernant la règle des 3Rs :

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger, incitation au fouissement ...)
- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés par des approches statistiques optimisées.
- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études.

Les études des effets pharmacologiques de candidat médicament sur la fonction respiratoire sont réalisées à des doses non toxiques et donc non susceptibles d'entraîner la mort ou des signes d'intolérance.

Le point limite pour ce projet est :

- Douleurs (cris de l'animal) ou détresse respiratoire marquées observées lors des mesures de respiration

Le choix de la technique de pléthysmographie corps entier et la durée des mesures (5-6 heures au maximum) minimise le stress des animaux, comme celle induit par la contention requise par d'autres techniques.

L'évaluation des paramètres ventilatoires par la technique de la pléthysmographie corps entier est classée avec un degré de sévérité léger.

Cette étude est réalisée sur des groupes de 6-8 animaux maximum. Cet effectif par groupe correspond au nombre minimum d'animaux nécessaires permettant de révéler les effets recherchés avec la sensibilité statistique requise dans ce type d'étude.

Compte tenu du nombre d'études réalisées pendant les années précédents, le nombre d'animaux maximum pour le présent projet (5 ans) est de 1200 rats, 200 souris et 100 cobayes.

16062 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, 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. Ces déficiences visuelles sont principalement dues à des rétinopathies pigmentaires ou à la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Au cours de ces pathologies, les photorécepteurs de la rétine sont affectés par une dégénérescence. Depuis de nombreuses années, le développement de techniques telle que la prothèse rétinienne redonne l'espoir à ces patients de restaurer leurs propriétés visuelles. Toutefois, cette technologie n'est pas accessible à des patients ayant perdu la vue suite à une rétinopathie diabétique (atteintes des vaisseaux sanguins de la rétine) ou à un glaucome (atteinte du nerf optique). Cette étude s'adresse à ce type de patients (ceux pour qui l'emploi d'une prothèse rétinienne est impossible) et elle a pour but de restaurer la vision chez ces patients.

Au cours de ce projet, nous voulons étudier la possibilité d'utiliser l'optogénétique dans la rétine et/ou des aires visuelles cérébrales comme outil pour restaurer la vision à des patients présentant des déficits visuels. Cette approche se fait en deux étapes. La première consiste en la transfection de neurones par des vecteurs permettant la synthèse d'une protéine sensible à la lumière (issue d'algue ou de bactérie) capable de créer un courant électrique au travers de la membrane cellulaire et d'activer ainsi la cellule. Cette technique a déjà donné des résultats encourageants chez le rongeur et le primate au niveau de différentes structures cérébrales. Nous injecterons des vecteurs dans une aire choisie préalablement (la rétine, le cortex visuel primaire ou le corps genouillé latéral) afin d'infecter un nombre maximal de neurones chez des primates non-humain. Ce modèle animal a l'avantage d'avoir un système visuel semblable à celui des hommes et de pouvoir apprendre des tâches comportementales visuelles complexes. La seconde étape consiste en l'enregistrement des activités neuronales par différentes méthodes (l'imagerie optique ou ultrasonore fonctionnelle et les enregistrements électrophysiologiques unitaires). Ainsi nous pourrons tester l'efficacité du système visuel à l'aide de 3 méthodes d'enregistrement différentes mais complémentaires

Au total 20 primates seront nécessaires à cette étude. Nous avons recours à ce modèle animal car il nous est nécessaire de disposer d'un système biologique dans son intégrité : de l'œil jusqu'au cerveau afin de comprendre comment les informations visuelles sont encodées au niveau des différentes structures neuronales (rétine, thalamus et cortex). Nous utiliserons aussi 10 rats pour faire des tests in-vivo de nos procédures.

Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie (vétérinaire compris). 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 ».

Nous prendrons soin de considérer la règle des 3R pour le bien-être des animaux :

- Remplacer : il nous est malheureusement impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intègre : de l'œil jusqu'au cerveau. Cependant, des premiers essais in-vitro et ex-vivo ont déjà été réalisés pour les méthodes de restauration visuelles qui seront testées sur le primate de façon *in vivo*.

- Réduire : Nous allons utiliser au maximum le principe des fenêtres chroniques afin de pouvoir réutiliser un même animal sur de multiples sessions d'expérimentation. De plus, il nous sera possible de croiser les protocoles de nos animaux afin de limiter une fois de plus le nombre de primates nécessaires. Il est possible aussi que nous récupérions des animaux destinés à être sacrifiés. Nous pourrons donc (une fois ceux-ci anesthésiés) réaliser diverses acquisitions (électrophysiologie/imagerie par ultrasons) avant la mise à mort.

- Raffiner : Les chirurgies préalables aux expériences étant invasives, nous prendrons grand soin des anesthésies et des analgésies réalisées avec des tests à la douleur réguliers. De plus, une surveillance régulière sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Dans le cas contraire on choisira une injection supplémentaire d'anesthésiant ou d'analgésiant, et en dernier recours, au sacrifice de l'animal. Nous prendrons grand soin des conditions stériles nécessaires lors des chirurgies afin d'éviter toute infection. Les animaux sont hébergés dans des cages de façon

appariée lorsque cela est possible. Une volière sera également mise à leur disposition régulièrement pour les primates.

16063 Au cours du développement des tumeurs, les cellules cancéreuses sont contraintes de modifier les voies utilisant les nutriments pour survivre face à un environnement carencé en glucose, acides aminés et oxygène. Ces modifications appelées collectivement "reprogrammation métabolique" et caractéristiques des cellules cancéreuses, vont notamment concerner une voie permettant la production de sucres nécessaires aux fonctionnalités des protéines. En condition de manque en nutriments, le flux de cette voie augmente paradoxalement et il exerce le plus souvent des effets positifs pour le développement de la tumeur. Caractériser les mécanismes qui contrôlent la stimulation de cette voie est donc nécessaire pour proposer à terme de nouvelles cibles thérapeutiques.

Il a été identifié précédemment que l'activation d'une protéine par une carence en nutriments, stimule la voie de synthèse de ces sucres et donc ses effets pro-cancer. Ces résultats ont été obtenus dans différents modèles de cellules tumorales pulmonaires et de colon. Ces modèles ont pour point commun de porter une mutation activatrice de KRAS, un oncogène déjà décrit pour également stimuler la voie des sucres mentionnée ci-dessus.

Les données chez l'homme montrent que cette protéine est fortement exprimée dans les cellules cancéreuses de carcinomes du poumon et colon, suggérant un rôle protumoral. Cette observation a été confirmée dans les modèles animaux utilisés pour ce projet. A l'inverse, la perte de cette protéine dans les modèles cellulaires suffit à bloquer la prolifération des cellules cancéreuses et améliore l'effet de la chimiothérapie par cisplatine.

Ce projet vise à donc i) mieux définir si l'augmentation de cette protéine accélère le développement des cancers et ii) confirmer chez l'animal, l'impact de l'inhibition de cette protéine en utilisant désormais un médicament en cours de développement sur la progression de cancers coliques et pulmonaires. Les approches *in vitro* désormais atteignent désormais les limites des modèles et l'animal constitue la seule alternative qui permette de prendre en compte de nombreux facteurs physiologiques susceptibles d'intervenir dans l'effet de la molécule testée

Pour cela, la procédure 1 permettra d'analyser si des cellules cancéreuses coliques et pulmonaires surexprimant ou non la protéine d'intérêt influence la croissance des tumeurs. Pour cela, des souris seront greffées en sous-cutanée avec des mêmes cellules et la croissance des tumeurs sera mesurée. Dans la procédure 2, il s'agira de déterminer, sur ces mêmes modèles de souris greffées, si l'inhibition de la protéine permet de limiter la croissance des tumeurs. Pour cela, la molécule sera administrée par voie orale aux animaux et son impact sur la croissance sera mesuré. Dans la dernière procédure, l'association de cette molécule en combinaison avec le cisplatine, chimiothérapie de première ligne, sera étudiée dans un modèle de souris développant des tumeurs pulmonaires.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée : 1-Réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Le suivi longitudinal des animaux par imagerie limitera le nombre de groupe utilisés puisqu'elle permettra de détecter les tumeurs et de suivre en cinétique les effets des thérapies sans avoir à mettre à mort un lot d'animaux à chaque temps étudié. De plus, une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux. 2-Raffinement : Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal. D'autre part, l'utilisation de l'anesthésie et d'une chambre thermostastée pour l'acquisition des données permettront de réduire la souffrance des animaux.

Le projet proposé inclut l'utilisation de 220 souris réparties sur 3 différentes procédures.

16064 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 synthétiques ou biologiques utilisés actuellement ne permettent souvent pas une réparation osseuse "ad integrum".

L'objectif principal de ce projet est de pouvoir recréer un os fonctionnel, c'est-à-dire un tissu vascularisé ayant la capacité de se minéraliser. Aussi notre première étape sera de promouvoir la vascularisation

en étudiant l'impact d'une prévascularisation *in vitro* de matrices de collagène cellularisées implantées en sous cutanée chez la souris. En effet, si des matrices cellularisées sont déjà utilisées en ingénierie tissulaire de l'os, l'intérêt de matrices cellularisées et prévascularisées, avant implantation dans des défauts cranio-faciaux, n'a encore été que peu investigué chez l'animal. Dans ce but, des cellules souches de pulpe dentaire humaine cultivées avec (ou sans) pré-traitement pour promouvoir la survie des cellules, seront combinées avec des cellules endothéliales, ensemencées dans des matrices de collagène et implantées dans une tranche de dent ou au sein d'un biomatériau inerte permettant leur implantation et leur analyse au cours du temps. Des expériences *in vitro* préalables ont montré l'intérêt d'associer ces deux types cellulaires pour créer un réseau vasculaire mature implantable. Le modèle de la tranche de dent est un modèle classique bien décrit dans la littérature et maîtrisé au laboratoire sur des souris immunodéprimées pour permettre l'implantation de cellules humaines. Il permet une analyse précise de l'angiogenèse par des techniques d'imagerie différentes selon les temps d'observation comme la tomographie par émission de positon (TEP) à un temps précoce et l'échodoppler et microtomographie haute résolution à des temps plus tardifs. Cette étude comportera donc 4 procédures qui permettront de suivre l'évolution du réseau vasculaire implanté sur 4 semaines. Elle nécessitera 60 animaux (nombre minimum pour permettre une étude statistique) répartis en différents groupes et temps afin de conclure sur l'intérêt de prévasculariser les matrices avant implantation tout en respectant le principe des 3R.

Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les analyses se feront sous anesthésie générale avec une médication anti-douleur systématique en per et également post-opératoire, si nécessaire, bien que les procédures soient peu invasives et que notre expérience avec ce modèle a montré une bonne tolérance de ces procédures. Une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée. Des points limites ont été définis au-delà desquels les animaux seront mis à mort. La régénération vasculaire et osseuse présente une biologie complexe impliquant participation et interaction de différents types cellulaires. Ces processus complexes ne peuvent être mimés en utilisant uniquement des cultures *in vitro* ou des modèles informatiques. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

16065 L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs se caractérise par le rétrécissement ou l'occlusion d'une artère des membres inférieurs ce qui provoque une mauvaise irrigation des tissus (ischémie) pouvant entraîner des amputations et des décès. C'est une pathologie fréquente puisqu'en 2010 on a estimé qu'elle touchait 202 millions de personnes dans le monde dont 40,5 millions en Europe. Pour les lésions inférieures à 25 cm, le traitement endovasculaire est choisi en première intention. Il s'agit d'introduire un stent dans l'artère afin de rétablir le flux sanguin. Des stents dits actifs ont récemment intégré l'arsenal thérapeutique. Ces stents sont recouverts d'une drogue antiproliférative afin d'éviter que l'artère ne se rebouche. Actuellement, deux types de stents actifs existent avec des caractéristiques différentes (concentration en drogue, revêtement, etc.). Plusieurs études ont été menées sur chacun de ces stents, mais aucune ne les a comparées en termes d'embolies distales avec cette drogue antiproliférative sur un modèle expérimental.

L'objectif principal de ce projet est de comparer les deux stents actifs disponibles sur le marché en termes d'embolies distales sur un modèle porcin. Les objectifs secondaires consistent à comparer la concentration en drogue dans la paroi artérielle, le plasma et sur les stents en fin de procédure.

L'étude se fait sur un modèle porc car son anatomie vasculaire est comparable à celle de l'homme. Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux vivants dans ce projet car aucun simulateur ne peut mimer la cascade de réactions métaboliques d'un organisme vivant. Dans une optique de raffinement, les porcs arrivent sur place au minimum une semaine avant la procédure pour leur permettre de s'habituer au lieu et ainsi de diminuer leur stress. Ils sont logés par quatre afin de respecter leur comportement grégaire, dans un box agrémenté de jouets. En cas de température inférieure à 10 degrés dans l'animalerie, un système de chauffage individuel est activé. Durant la procédure un analgésique est administré aux animaux. En outre, des paramètres comme la température rectale ou la fréquence cardiaque sont monitorés afin de s'assurer du bien être des animaux. En cas de rupture de ceux-ci la procédure sera interrompue. La procédure n'étant pas traumatique pour les porcs, il n'y

aura d'analgésie systématique en post-opératoire. Cependant, Le personnel animalier observe le comportement des porcs matin et soir lors de la distribution de la nourriture afin de repérer d'éventuels signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation. Les animaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance seront soignés et si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant retirés de l'essai. Six animaux par type de stent, soit un total de douze animaux seront nécessaires pour l'ensemble de l'étude. Le choix de six animaux par groupe s'est appuyé sur une précédente étude dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

16066 Le vieillissement cellulaire, ou sénescence, est un processus participant au vieillissement de l'organisme et aux pathologies associées dont le cancer. Les cellules sénescents sécrètent de nombreux facteurs qui sont impliqués notamment dans la prolifération et la migration cellulaire. On parle alors de SASP pour Senescence Associated Secretory Phenotype. Une hypothèse émise est que les facteurs sécrétés composant le SASP favoriseraient le développement tumoral. Des études *in vitro* ont montré que le SASP induit une différenciation de type neuroendocrine chez des cellules épithéliales cancéreuses mammaires d'origine humaine. Ces résultats doivent être validés dans un modèle plus complexe *in vivo*. Le but de ce protocole est de montrer que les facteurs du SASP induisent bien une différenciation neuroendocrine dans une tumeur mammaire. L'impact sur la prolifération et l'agressivité tumorale sera également étudié. Pour cela des greffes de cellules humaines de cancer du sein seront réalisées en sous-cutané chez la souris (modèle de xénogreffe). Les animaux seront ensuite traités pendant plusieurs semaines avec du SASP et la mesure du volume tumoral tout au long de ce protocole permettra de suivre la croissance de la tumeur. En fin de protocole les tumeurs seront prélevées et examinées pour valider ou non la différenciation neuroendocrine suite au traitement avec le SASP. De plus un examen attentif de l'animal sera réalisé à la fin du protocole pour observer si le traitement avec le SASP a permis le développement de métastases.

Ce protocole nécessitera l'utilisation de 100 souris.

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 pour pouvoir valider définitivement nos résultats.

Réduire: le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Une analyse de la littérature nous permet également d'éviter toute répétition inutile.

Raffiner: une définition précise des points limites précoces et prédictifs ainsi qu'une surveillance adaptée pendant tout le protocole permet de limiter l'apparition d'une souffrance ou d'une atteinte de l'état général de la souris. En cas d'atteinte de ces points limites les animaux seront sortis de l'étude et mis à mort.

16067 Les cellules dendritiques sont les sentinelles de notre système immunitaire. Elles patrouillent dans les tissus périphériques tels que la peau en échantillonnant le milieu extracellulaire qui les entourent à la recherche de pathogènes ou de signaux de danger pour l'organisme. Quand elles détectent un signal de danger, elles acquièrent un mode de migration plus rapide et dirigé vers les ganglions lymphatiques drainants où elles activent les lymphocytes T, ce qui induit une réponse immune adaptative. Cette migration des cellules dendritiques dans les tissus puis vers les ganglions et l'activation subséquente des lymphocytes T est essentielle pour les réponses immunitaires contre les infections (virales ou bactériennes), mais aussi pour les réponses anti-tumorales ou pour le succès de la vaccination.

La migration des cellules dendritiques est entre autres contrôlée par le calcium. Nous souhaitons étudier *in vivo* le potentiel thérapeutique d'une molécule qui contrôle le flux de calcium dans les cellules dendritiques et qui a déjà démontré des effets positifs sur la migration des cellules dendritiques *in vitro*. Nous évaluerons l'effet de cette molécule sur la migration des cellules dendritiques et ses conséquences sur la réponse immunitaire anti-tumorale qui en découle.

Nous utiliserons 423 souris pour ce projet.

Remplacer : Les expériences *in vivo* envisagées enrichiront les expériences déjà réalisées *in vitro*, qui ont donné le maximum de réponses aux hypothèses posées par notre problématique.

Réduire : Des expériences pilotes seront réalisées pour déterminer les meilleures conditions dans la réalisation des expériences *in vivo*. Les expériences seront conduites pour éviter au maximum la variabilité entre les réplicats nécessaires à la qualité statistique.

Raffiner : Le confort des animaux sera pris en compte lors des différentes procédures, que ce soit dans les conditions expérimentales notamment avec l'emploi d'un anesthésiant et d'un analgésique ou que ce soit dans les conditions d'hébergement.

16068 Les dysplasies acroméliques forment un groupe de pathologies rares caractérisées par une petite taille (nanisme), une raideur des articulations et des extrémités courtes (mains et pieds). En plus des anomalies chondrosquelettiques, certains patients présentent des complications cardiaques et pulmonaires pouvant provoquer un décès prématuré. A ce jour, aucun traitement n'est disponible pour les patients atteints de ces pathologies.

Ces dernières années ont vu émerger l'identification d'un certain nombre de gènes impliqués dans la physiopathologie des dysplasies acroméliques. Ces gènes codent pour des protéines de fonctions variées dont le rôle exact dans le développement osseux et cardio-pulmonaire n'est souvent pas clairement établi.

Le but de ce projet est d'apporter une meilleure compréhension de la fonction de trois de ces gènes afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

La formation et la croissance de l'os sont des processus fortement régulés qui requièrent l'interaction de plusieurs types cellulaires et l'implication de facteurs de croissance spécifiques. Ils ne peuvent être reproduits en culture cellulaire, ce qui rend donc l'étude des modèles murins indispensable.

Pour cela, nous utiliserons des modèles murins génétiquement modifiés mimant respectivement 3 types de dysplasie acromélique humaine : la première présente des anomalies du squelette osseux plus des atteintes bronchopulmonaire et cardiaque; le deuxième des anomalies du squelette osseux sans atteinte bronchopulmonaire et cardiaque et le troisième, une atteinte du squelette osseux à laquelle s'ajoutent des anomalies des mâchoires et des dents. L'analyse des effets des mutations sur les tissus cibles de ces souris sera réalisée après euthanasie à des temps différents temps du développement. Un essai de traitement par injection intra-péritonéale d'anticorps sera effectué sur le premier modèle. Cette étude devrait permettre d'analyser les différents aspects communs et spécifiques de ces pathologies. Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R en limitant le nombre d'animaux au strict minimum permettant de valider de façon statistique les résultats obtenus. Dans un premier temps, l'étude des protéines d'intérêt impliquées dans le processus physiopathologique des dysplasies acroméliques et les conséquences des mutations géniques de ces fonctions sera effectuée sur des cultures de fibroblastes de patients, de même que l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques sur la restauration de ces fonctions.

Les souris utilisées dans le cadre de notre projet seront surveillées quotidiennement. Pour améliorer leur confort, elles feront l'objet de raffinement (copeaux, facilitation de l'accès à la nourriture). Pour alléger les douleurs, le suivi quotidien sera réalisé à l'aide de tables d'évaluation comportementale adaptées aux âges des souris et elles recevront des anesthésiants et des analgésiques lorsque cela sera nécessaire. Des points-limites pour chaque tranche d'âge ont été établis. Un score de douleur trop élevé impliquera l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude. Dans le but de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous effectuerons l'étude de nos trois modèles murins en parallèle en harmonisant le plus possible les stades et les tissus étudiés ainsi que les techniques utilisées. Au total, un maximum de 505 souris seront utilisées pour réaliser notre étude sur 5 ans. Ce projet fondamental et pré-clinique devrait permettre de nouvelles approches thérapeutiques.

16069 Ce projet a pour but de caractériser le profil toxicologique de candidats médicaments ciblant le facteur VIII chez des rats prédisposés à l'Hémophilie A. L'objectif de ces études précliniques est d'identifier les doses thérapeutiques, le candidat médicament le plus efficace et les fréquences d'administration, pour

les études cliniques chez l'Homme. A terme, l'objectif est de proposer une thérapie pour les patients atteints de cette maladie.

L'hémophilie A résulte d'un déficit en facteur VIII, un facteur de coagulation indispensable à la formation des caillots sanguins. Son insuffisance ou son altération se traduit par des saignements prolongés en cas de coupure ou de traumatisme, ou parfois même sans raison dans les formes sévères de la maladie : on parle d'hémorragies spontanées. L'hémophilie A représente la forme d'hémophilie de loin la plus fréquente : 80 % des hémophiles souffrent d'un déficit en facteur VIII. Dans la quasi-totalité des cas, les malades sont des hommes mais les femmes peuvent être aussi touchées plus rarement. Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R.

À l'heure actuelle, les études sur les animaux de laboratoire constituent la meilleure base disponible pour l'extrapolation à l'homme et sont nécessaires pour étayer les demandes réglementaires. Il n'existe actuellement aucun modèle de remplacement acceptable n'utilisant pas d'animaux vivants dans l'étude de l'hémophilie A. Le nombre total d'animaux à utiliser dans cette étude (28 animaux) est considéré comme le minimum requis pour caractériser correctement les effets pharmacocinétiques des candidats médicaments (5 animaux/groupes + 3 animaux supplémentaires). Ce projet a été conçu de manière à utiliser un nombre réduit d'animaux pour atteindre ses objectifs.

Les rats seront hébergés dans un milieu enrichi (une petite quantité une poignée de papier déchiqueté sera placée dans chaque cage et les animaux auront libre accès à un bloc à ronger en bois, + tunnel + litière). Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids.

Les rats seront mis à mort à la fin du protocole (prélèvement de sang pour étude pharmacocinétique après une administration du candidat médicament par voie orale) ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation. En cas de saignement après blessure/prélèvement/injection, un point de compression sera réalisé. Si celui-ci est insuffisant, un point de colle chirurgicale sera appliqué. Dans le cas où le saignement ne peut être arrêté l'animal sera mis à mort.

Au total, cette étude nécessitera 28 rats

16070 La perte de masse musculaire due au vieillissement (i.e., Sarcopenie) est l'un des principaux facteurs de risques de perte d'autonomie entraînant un plus grand isolement ainsi qu'une morbidité plus importante. Nos études préliminaires effectuées *in vitro* ont permis d'établir un lien entre le déficit d'une protéine télomérique dans la cellule musculaire et l'augmentation du niveau de stress oxydatif. Néanmoins, la culture cellulaire ne peut résumer la réalité physiologique d'un organisme entier, spécialement le muscle, tissu majoritairement post-mitotique et innervé qui n'est pas reproductible *in vitro*. Afin de confronter ces données à la réalité *in vivo*, nous proposons d'utiliser une lignée murine dite knock-out déjà établie dans notre équipe, comprenant l'inactivation spécifique de la protéine télomérique dans les fibres musculaires matures.

Les souris seront caractérisées par une série d'analyses de tests de forces qui permettront une évaluation de leur condition physique durant le vieillissement et selon leur génotype. Une semaine après avoir été soumises aux tests de force, les souris seront mises à mort et les muscles prélevés exploités pour des analyses biologiques, métaboliques et histologiques.

Il semblerait que la force soit plus importante chez les femelles, et a fortiori chez les femelles dites « âgées » ainsi que chez les KO par rapport aux souris dites contrôles porteuses du gène exprimant la protéine télomérique. Nous cherchons donc à confirmer ces résultats en comparant mâles et femelles jeunes et âgés avec des effectifs égaux.

Cette inactivation a déjà été caractérisée et engendre un phénotype léger de vieillissement musculaire. Nous considérerons d'appliquer le protocole sur 2 lignées comprenant la lignée KO dans le muscle pour la protéine télomérique, et une lignée contrôle. Le protocole sera appliqué à deux âges, l'un à 6/8 mois (souris jeunes) et à 14/17 mois (souris dites vieilles) afin d'étudier l'évolution de la force avec l'âge. Nous utiliserons un total de 84 souris.

Conformité à la règle des 3Rs:

-Raffinement: nous avons mis en place un suivi strict et régulier des animaux grâce à l'utilisation d'une grille de score qui définit des points limites clairs, précis et précoces. Pour les besoins des tests de force (indolores pour l'animal), les animaux sont anesthésiés et placés dans un berceau chauffant pour maintenir leur température corporelle. La procédure dure 20 à 30 minutes.

-Réduction: pour réaliser ce projet en 5 ans, nous utiliserons un maximum de 84 animaux. Le nombre de souris utilisées dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes. Les deux muscles de chaque patte arrière sont collectés pour obtenir la plus grande quantité d'informations de ces souris.

Remplacement : Le projet se base sur des résultats scientifiques obtenus *in vitro* sur des cellules musculaires humaines. Cependant, le processus physiologique du vieillissement ne peut pas être réalisé, à l'heure actuelle, sur des cultures cellulaires.

16071 L'échographie est une méthode d'imagerie non invasive, non ionisante, qui permet l'étude des tissus mous. Beaucoup des applications de l'échographie concernent l'exploration de la cavité abdominale, pour l'examen de l'aspect morphologique des organes, l'étude des flux sanguin et la détection de masses suspectes. Il existe des appareils spécifiques offrant une résolution qui permet d'avoir un niveau de détail anatomique suffisant pour transférer des méthodes d'examen, validées chez l'homme ou le gros animal, vers le petit animal.

Cette modalité d'imagerie est de plus en plus utilisée en recherche chez le petit animal pour réduire de nombre d'animaux suivis dans une étude (suivi de taille de tumeur par imagerie au lieu de sacrifice séquentiel des animaux) mais également pour obtenir plus d'informations sur le développement de la pathologie (mesures de paramètres de flux sanguin *in vivo* par exemple), le tout sans souffrance de l'animal, sous anesthésie générale.

Toutefois, il n'existe à notre connaissance aucune formation pratique à l'échographie abdominale du rongeur à destination des chercheurs, et il existe une forte demande pour une formation initiale. Le public utilisant ces appareils pour le petit animal est assez varié et va du chercheur en méthodologie d'imagerie au technicien animalier, en passant par les médecins en thèse de science ou les chercheurs en biologie.

Nous organisons donc une formation à l'échographie abdominale du petit animal permettant d'aborder beaucoup de problématiques rencontrées en laboratoire : suivi de gestation, mesures anatomiques abdominales, mesures de dimensions de vaisseaux et flux associés. Nous aborderons enfin l'injection guidée dans l'embryon qui est une méthode très puissante pour intervenir dans le développement de l'embryon pour tenter par exemple de réintroduire des cellules souches pour rattraper une mutation létale.

Nous avons prévu de réutiliser au maximum les souris au cours de cette session de formation pour limiter le nombre d'animaux utilisés. Tous les animaux sont anesthésiés (et analgésiés si besoin) pour les expériences, et leur durée d'anesthésie est limitée à 60 minutes au maximum. Les points limites ont également été définis, entraînant la mise à mort anticipée si nécessaire. Concernant l'hébergement: l'eau et la nourriture sont fournies à volonté et le milieu est enrichi par des cotons compactés.

Nous prévoyons de faire 3 formations par an, sur 5 ans en utilisant au total 360 souris, 540 embryons de souris, 90 rats et 270 embryons de rats.

16072 Ce test permet de mesurer le comportement de type anxieux chez le rongeur. Il constitue le test le plus couramment utilisé pour le développement de nouveaux anxiolytiques et d'une manière plus générale pour la mise en évidence des effets de nouvelles molécules sur l'anxiété.

Les rongeurs placés dans un labyrinthe en croix surélevé étant de nature craintive, on constate qu'ils passent préférentiellement plus de temps dans les bras fermés. Lors de l'exploration de son environnement, l'animal va passer d'un bras à l'autre. Le temps et le nombre d'entrée dans chacun des deux types de bras sont comptabilisés. Le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts est considéré comme un bon indicateur du niveau d'anxiété des rongeurs.

Le test est réalisé sur des rats.

Une étude standard comprend 60 animaux répartis en 5 groupes de 12 rats, 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 20.

Le nombre total maximum d'animaux 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 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.

16073 Ce test permet de mesurer le comportement de type anxieux chez le rongeur. Ce test est le plus couramment utilisé pour le développement de nouveaux anxiolytiques et d'une manière plus générale pour la mise en évidence des effets de nouvelles molécules sur l'anxiété.

Les rongeurs placés dans un labyrinthe en croix surélevé étant de nature craintive, on constate qu'ils passent préférentiellement plus de temps dans les bras fermés. Lors de l'exploration de son environnement, l'animal va passer d'un bras à l'autre. Le temps et le nombre d'entrée dans chacun des deux types de bras sont comptabilisés. Le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts est considéré comme un bon indicateur du niveau d'anxiété des rongeurs.

Le test est réalisé sur des souris.

Une étude standard comprend 60 animaux répartis en 5 groupes de 12 souris, 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 20.

Le nombre total maximum d'animaux 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 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.

16074 Les cellules dendritiques sont les sentinelles de notre système immunitaire. Elles patrouillent dans les tissus périphériques tels que la peau en échantillonnant le milieu extracellulaire qui les entourent à la recherche de pathogènes ou de signaux de danger pour l'organisme. Quand elles détectent un signal de danger, elles acquièrent un mode de migration plus rapide et dirigé vers les ganglions lymphatiques drainants où elles activent les lymphocytes T, ce qui induit une réponse immune adaptative. Cette migration des cellules dendritiques dans les tissus puis vers les ganglions et l'activation subséquente des lymphocytes T est essentielle pour les réponses immunitaires contre les infections (virales ou bactériennes), mais aussi pour les réponses anti-tumorales ou pour le succès de la vaccination.

La migration des cellules dendritiques est entre autres contrôlée par le calcium. Nous souhaitons étudier *in vivo* le potentiel thérapeutique d'une molécule qui contrôle le flux de calcium dans les cellules dendritiques et qui a déjà démontré des effets positifs sur la migration des cellules dendritiques *in vitro*. Nous évaluerons l'effet de cette molécule sur la migration des cellules dendritiques et ses conséquences sur la réponse immunitaire anti-tumorale qui en découle.

Nous utiliserons 423 souris pour ce projet.

Remplacer : Les expériences *in vivo* envisagées enrichiront les expériences déjà réalisées *in vitro*, qui ont donné le maximum de réponses aux hypothèses posées par notre problématique.

Réduire : Des expériences pilotes seront réalisées pour déterminer les meilleures conditions dans la réalisation des expériences *in vivo*. Les expériences seront conduites pour éviter au maximum la variabilité entre les réplicats nécessaires à la qualité statistique.

Raffiner : Le confort des animaux sera pris en compte lors des différentes procédures, que ce soit dans les conditions expérimentales notamment avec l'emploi d'un anesthésiant et d'un analgésique ou que ce soit dans les conditions d'hébergement.

16075 Contexte : La myéloméningocèle (MMC) est une malformation de la moelle épinière et de la colonne vertébrale qui induit une morbidité sévère chez les enfants, représentée par une paralysie des jambes, une incontinence urinaire et fécale, ainsi que des complications au niveau du cerveau qui peuvent mener à une déficience intellectuelle. Les MMC ont une incidence de 1/1000 grossesses. Elles sont dans la grande majorité des cas diagnostiquées avant la naissance, lors de l'échographie du deuxième trimestre de la grossesse. Depuis 10 ans, il est démontré que la chirurgie *in utero* permet une amélioration des enfants, d'une part, sur leur capacité à marcher, et d'autre part, en diminuant le risque de complication cérébrale. Malheureusement, cette chirurgie *in utero* ne permet pas une guérison de cette malformation puisque 71 % des enfants ne peuvent pas marcher sans aide à l'âge scolaire, et 62 % sont obligés de réaliser des sondages urinaires quotidiens. Il est donc nécessaire d'améliorer la technique de chirurgie *in utero* pour améliorer la réparation de la moelle épinière et, in fine, le pronostic de ces enfants.

Nous proposons ici un projet de recherche expérimentale chez l'ovine afin d'étudier l'intérêt de la thérapie par les cellules souches dans la chirurgie *in utero* des MMC.

La première phase de cette recherche a fait l'objet de travaux antérieurs permettant d'isoler des cellules souches mésenchymateuses à partir de cordons ombilicaux ovins et de caractériser ces cellules. Cette caractérisation nous a permis de nous assurer que ces cellules possèdent des propriétés intéressantes pour réparer la moelle épinière (sécrétion de facteurs neuroprotecteurs). Nous avons ainsi créé une banque de cellules souches mésenchymateuses ovines. Nous avons également déterminé, lors de ces travaux préliminaires, le nombre idéal de cellules à insérer dans les patches.

Objectifs : L'objectif principal de notre étude est de montrer une amélioration des fonctions motrices à la naissance dans un groupe d'agneau dont la MMC sera réparée *in utero* par un patch de cellules souches mésenchymateuses. Nos objectifs secondaires sont d'étudier le mécanisme d'action de ces cellules ainsi que leurs potentiels effets secondaires.

L'expérimentation est réalisée sur le modèle ovin chirurgical de MMC et consiste à comparer deux groupes d'animaux. Dans le premier groupe, une MMC est créée chirurgicalement au 75^e jour de gestation et est réparée au 90^e jour de gestation, à l'aide d'un patch de cellules souches et d'une suture cutanée. Quinze fœtus seront opérés dans chacun des groupes soit un total de 30 fœtus opérés (et 30 brebis gestantes). Dans le groupe contrôle, une MMC est créée chirurgicalement au 75^e jour de gestation et la MMC est réparée au 90^e jour de gestation, à l'aide d'un patch acellulaire et d'une suture cutanée. La mise-bas est déclenchée à terme par une induction du travail. À la naissance, un examen clinique des agneaux est pratiqué pour évaluer leur fonction motrice puis les agneaux sont euthanasiés afin d'effectuer les prélèvements nécessaires à l'étude des critères secondaires. Les 30 agneaux seront euthanasiés et les 30 brebis seront réhabilitées.

Respect de la Règle des 3R

Remplacement : les expérimentations *in vitro* préliminaires aux expérimentations *in vivo* ont permis de s'assurer en amont de la vitalité des cellules greffées, de leurs fonctions neuroprotectrices ainsi que de déterminer le nombre de cellules à greffer.

Réduction : Les brebis porteuses d'un seul fœtus seront sélectionnées en priorité pour limiter l'euthanasie de jumeaux qui ne seraient pas opérés *in utero*. À l'issue des naissances, les brebis seront réhabilitées. Notre équipe possède une grande expertise en chirurgie fœtale chez ce modèle ovin du fait de 7 années de travail sur les techniques chirurgicales *in utero* des MMC moins invasives. Ceci nous permet d'obtenir un nombre limité d'avortements (consécutifs à la chirurgie). Nos résultats préliminaires pour ce projet (chirurgie chez 20 animaux) nous ont permis d'obtenir des résultats très encourageants et également de calculer le nombre minimal d'animaux à inclure pour permettre une analyse statistique et de tirer des conclusions pertinentes.

Raffinement : Un habitat adapté et enrichi sera mis en place, en limitant l'isolement des brebis à 5 jours après chaque chirurgie et en leur permettant de voir et d'entendre les autres brebis pendant cette période. Chaque intervention sera réalisée sous anesthésie générale maternelle avec une analgésie fœtale complémentaire si nécessaire. Un traitement antalgique sera administré de manière systématique durant les 5 jours qui suivent chaque chirurgie.

16076 Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche de vaccins contre des maladies infectieuses. En effet, certaines de ces maladies provoquent une mortalité importante, et la vaccination est une solution très efficace, en particulier si les traitements sont longs et coûteux (comme dans le cas du paludisme, par exemple), ou inexistantes (par exemple, la maladie de Chagas, maladie parasitaire proche de la maladie du sommeil, qui sévit surtout en Amérique latine). La vaccination classique peut se faire à partir des agents infectieux rendus inoffensifs par différents traitements, mais n'est pas toujours efficace, ni sans risque. Il faut alors se tourner vers des vaccins dit sous-unitaires, qui correspondent à une (ou des) protéine(s) particulières de l'agent infectieux, et que l'on appelle antigène(s). Ces vaccins sont par ailleurs plus faciles à produire, moins coûteux, et plus simples d'utilisation.

La recherche d'antigènes efficaces est un processus long et compliqué. Après détermination des antigènes possibles par différentes méthodes, la dernière étape consiste à tester chez l'animal la capacité de ces antigènes à provoquer une réponse immunitaire capable de lutter contre l'agent

infectieux. L'objectif de ce projet est de tester chez l'animal, la souris en particulier et le lapin si nécessaire, la capacité de nouveaux antigènes à induire un fort taux d'anticorps neutralisant les agents infectieux, dans le cas en particulier du paludisme et de la maladie de Chagas, sans être exhaustifs, d'autres antigènes d'autres origines pouvant être envisagés. Les anticorps seront prélevés et analysés afin d'étudier leurs propriétés fonctionnelles par des tests *in vitro*. La vaccination peut se faire de plusieurs façons :

- en possédant l'antigène sous sa forme protéique, comme dans les vaccins sous-unitaires commerciaux. Ce vaccin est administré par injection intramusculaire chez l'homme et le lapin, par voie intrapéritonéale chez la souris.

- en utilisant la séquence d'ADN ou d'ARN qui est capable de produire cet antigène. On parle alors de vaccination génétique. Cette méthode offre l'avantage d'induire une réponse immunitaire de meilleure qualité, mais ne marche pas toujours. Ce vaccin est administré par injection intramusculaire suivie de l'application d'impulsions électriques.

Nous utiliserons ces deux méthodes pour vacciner les animaux, avec en premier choix la vaccination génétique. Si cela ne donne aucun résultat, nous utiliserons la vaccination protéique. Dans le but d'identifier des antigènes permettant une protection contre les parasites du paludisme ou de la maladie de Chagas après vaccination, nous serons amenés à tester différents antigènes. Un prélèvement sanguin et une analyse des anticorps obtenus nous permettront d'évaluer l'efficacité de la réponse immunitaire obtenue.

Nous évaluons le nombre maximum de souris impliquées à 300 sur 5 ans. Par ailleurs, si des antigènes très prometteurs sont identifiés, nous devons montrer l'efficacité sur une autre espèce que la souris : nous utiliserons le lapin, 20 au maximum sur 5 ans. Soit au total : 320 animaux au maximum.

Afin de remplacer au maximum l'expérimentation animale, un long travail de détermination des antigènes candidats sera effectué en amont de l'expérience par des méthodes analytiques ou bioinformatiques. Pour réduire le nombre d'animaux, nous travaillerons sur des groupes peu importants de souris (5 souris) que nous savons déjà être suffisants. Nous n'effectuerons les expériences sur lapin qu'en cas de nécessité sur deux lapins au maximum par antigène identifié. En ce qui concerne le raffinement, dans le cas d'application d'impulsions électriques, les animaux seront anesthésiés par voie générale et surveillés à leur réveil. Enfin, les souris seront hébergées en milieu enrichi par de petits abris de nidification et du coton, les lapins individuellement dans des cages standards.

Les avantages escomptés de ce projet sont d'identifier des antigènes pouvant être des candidats vaccins. Les expériences consistent principalement en des injections intramusculaires suivies ou non d'impulsions électriques sur lesquels nous avons un grand recul : nous n'escomptons aucun dommage particulier. Les animaux seront donc suivis les deux jours suivant la vaccination, puis deux fois par semaine ensuite de façon standard.

16077 Le choc cardiogénique est une défaillance aigüe et sévère de la pompe cardiaque qui entraîne une diminution de l'oxygène disponible pour les différents organes. Dans 80 % des cas, les chocs cardiogéniques sont dus à un infarctus du myocarde. Il est associé à une mortalité importante (40 %). Son traitement suit deux axes : le traitement de la cause lorsque celle-ci est connue et qu'un traitement est disponible et le traitement symptomatique qui doit être initié le plus rapidement possible afin d'éviter l'évolution vers une défaillance multiviscérale. Lorsque l'approche médicamenteuse ne permet pas d'amélioration, une assistance circulatoire mécanique de courte durée peut être mise en place afin de reperfuser précocement les organes. Celle-ci passe par la mise en place d'une circulation extracorporelle inspirée de celle utilisée en chirurgie cardiaque. Cependant cette assistance circulatoire mécanique peut entraîner une reperfusion brutale de l'organisme et notamment des organes digestifs (phénomène d'ischémie-reperfusion). Ce phénomène est responsable d'une inflammation systémique et d'une perte de tonus des parois des artères qui participe à l'échec de l'assistance circulatoire. De plus, l'assistance circulatoire mécanique influe aussi sur la récupération du cœur et donc la mortalité tardive, car elle ne se synchronise pas sur le rythme cardiaque du patient.

Un nouveau dispositif délivrant un flux pulsatile et synchronisé sur le cycle cardiaque du patient a été développé. Ce dispositif permettrait d'améliorer la reperfusion des organes afin de diminuer les risques de défaillance multiviscérale, et la récupération myocardique.

Ce nouveau dispositif n'ayant jamais été testé *in vivo*, l'objectif de ce projet est de valider le modèle de choc cardiogénique avec ischémie-reperfusion digestive et de valider la faisabilité de l'implantation de ce dispositif ainsi que les modalités de monitoring clinique, biologique et échocardiographique.

L'étude se fait sur un modèle porc, car son anatomie cardio-vasculaire est comparable à celle de l'homme. Pour répondre aux objectifs de l'étude, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux, car le phénomène de choc cardiogénique avec ischémie-reperfusion digestive est trop complexe pour être mimé en laboratoire. Dans une optique de raffinement, les porcs arrivent sur place au minimum une semaine avant la procédure pour leur permettre de s'habituer au lieu et ainsi de diminuer leur stress. Ils sont logés en groupe afin de respecter leur comportement naturel, dans un box agrémenté de jouets. En cas de température inférieure à 10 degrés dans l'animalerie, un système de chauffage individuel est activé. De plus, durant la procédure, des paramètres comme la température rectale sont monitorés afin de s'assurer du bien être des animaux. En cas de rupture de ceux-ci la procédure sera interrompue. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, il n'y aura pas de groupe témoin dans cette étude de faisabilité. Dix porcs sont donc inclus dans le projet.

16078 La région cervicale est composée d'environ 80 muscles chez l'Homme qui permettent la mobilité de la tête, mais aussi les processus de respiration, de déglutition et de vocalisation. Ces processus sont assurés par un réseau musculaire robuste reliant la tête et le tronc, qui est préférentiellement affecté dans certaines pathologies musculaires humaines de naissance (dystrophie musculaire congénitale, syndrome de DiGeorge) ou dégénératives à l'âge adulte (myopathie idiopathique cervicale). Afin de comprendre pourquoi certains groupes musculaires sont davantage touchés dans ces pathologies, il est primordial d'élucider l'origine de leur hétérogénéité au cours du développement embryonnaire.

Notre équipe a montré chez l'embryon de souris que les gènes *Dlx*, exprimés dans les cellules qui forment les os et tendons des mâchoires, ont un rôle essentiel pour la formation des muscles masticateurs associés. De plus, il a récemment été démontré que les gènes *Dlx* sont aussi impliqués dans le développement de certains muscles cervicaux mais leurs fonctions sont encore inconnues.

Ce projet de recherche fondamentale d'une durée de trois ans vise à définir les limites d'implication et rôles des gènes *Dlx* au cours de la formation musculo-squelettique cervicale. Les résultats pourraient permettre de mieux comprendre la susceptibilité de groupes musculaires à être affectés préférentiellement dans certaines pathologies humaines.

Pour ce faire, nous utiliserons des lignées de souris génétiquement modifiées disponibles au sein du laboratoire. Le développement embryonnaire est un processus complexe qui implique l'interaction de nombreux types cellulaires qui peuvent ni être modélisés, ni reproduits *in vitro* en culture, ce qui rend inévitable de réaliser ces expériences chez l'animal. Plus particulièrement, effectuer ces observations chez la souris permet une approche génétique nécessaire à l'étude de la formation musculaire sur un modèle de mammifère proche de l'Homme.

Ce projet ne nécessite pas de modifier le génome de souris, mais de croiser des lignées existantes, dont les individus ne présentent pas de troubles physiques ou de santé. En revanche, il s'agit d'accoupler les individus issus de ces lignées pour générer des embryons et fœtus qui permettront d'analyser le rôle des gènes d'intérêt. En termes d'entretien, les souris seront hébergées dans des conditions optimales par fratries de même sexe dans des cages de surface au minimum égale aux recommandations en vigueur, avec nourriture et eau à volonté, et présence d'igloos (refuges) et de bâtonnets ouatés pour la confection de nids renforçant leur sentiment de sécurité. Pour les accouplements, procédure naturelle et non invasive, un mâle et deux femelles seront isolés dans une cage pour reproduction temporisée sur la nuit. Les femelles seront observées le matin pour s'assurer de l'accouplement (bouchon vaginal) puis seront séparées du mâle dans une nouvelle cage et surveillées de manière journalière. Au stade de développement d'intérêt, les femelles seront euthanasiées et les embryons ou fœtus seront collectés dans le respect du bien-être animal de manière non douloureuse pour analyses anatomiques, histologiques et moléculaires. Dans un souci de

réduction maximale du nombre d'animaux sacrifiés, chaque échantillon sera exploité dans le but de réaliser plusieurs analyses en parallèle sur le même animal. Cependant, un nombre minimal de trois spécimens de phénotype et stade d'intérêt seront nécessaires pour s'assurer de la validité des résultats expérimentaux en triplicats. Finalement, nous estimons le nombre d'animaux à 92 sur la durée totale de trois ans du projet, incluant 64 fœtus, 16 femelles gestantes, 8 mâles reproducteurs et 4 animaux adultes destinés à l'analyse.

Les connaissances nouvelles que nous produirons permettront de mieux appréhender l'origine de certaines pathologies humaines caractérisées par des atteintes spécifiques du système musculo-squelettique cervical.

16079 L'obésité est une maladie chronique qui se caractérise principalement par un excès de masse grasse (adiposité élevée) se traduisant par un excès de poids (Indice de Masse Corporelle >30). S'il est établi que de nombreux facteurs génétiques et métaboliques peuvent intervenir dans l'installation de l'obésité, il s'avère qu'elle est principalement la conséquence d'une mauvaise alimentation et d'un mode de vie sédentaire. Elle est à l'origine de multiples complications cardiovasculaires (hypertension artérielle, insuffisance cardiaque), respiratoires, rhumatologiques (arthrose), métaboliques et endocriniennes (maladies dues à des perturbations du métabolisme des lipides, des glucides et de l'insuline), et enfin cancéreuses (cancer de la prostate ou colorectal). Malgré l'intérêt scientifique croissant suscité par ce syndrome, notamment en raison du problème majeur de santé publique qu'il soulève, ses raisons pathologiques ne sont pas élucidées, et sa définition comme ses critères diagnostiques pas encore harmonisés. De nombreuses études suggèrent cependant que l'obésité serait associée à un certain nombre de marqueurs qui peuvent être mesurés dans le sang et/ou les tissus (foie, muscle, tissu adipeux). Le but de nos travaux est de rechercher des marqueurs de la sensibilité à l'obésité induits par un régime gras et sucrés sur un modèle de souris très utilisé pour les recherches dans le domaine de la nutrition et reconnu pour présenter comme l'Homme, une grande variabilité des individus à l'obésité. Nous utilisons 2 types de régimes : un régime d'entretien standard et un régime riche en gras et en sucres. Les mécanismes à l'origine de l'obésité n'étant pas identiques chez les mâles et les femelles du fait du contexte hormonal et d'une distribution différente des masses grasses, cette étude sera réalisée sur les deux sexes. Des études antérieures ont montré que le récepteur a un neuropeptide présent dans le cerveau, un récepteur impliqué dans la prise alimentaire, a un rôle dans la prise de poids des souris. En effet, il a été montré que le traitement par ce neuropeptide freinait ou stoppait complètement la prise de poids des souris soumises au régime gras-sucré. Afin de compléter ces études, cette prochaine expérience qui inclura 80 souris évaluera sur une période de 2 ans les effets du traitement avec ce neuropeptide sur la prise de poids sur des souris dépourvues génétiquement de l'expression de ses récepteurs. Ces souris génétiquement modifiées ne présentent aucune souffrance, aucune anomalie dans leur confort de vie et dans leur métabolisme aussi bien en régime standard qu'en régime gras et sucré. Cette expérience devra démontrer la spécificité du rôle du neuropeptide sur la prise de poids. Le régime gras-sucré sera administré pendant 12 semaines sur 32 individus mâles et 32 individus femelles, sur la base de nos travaux précédents, nous pouvons anticiper qu'environ 25% des souris (10 souris) seront très sensibles au régime et réciproquement seules 25% des souris (10 souris) y seront franchement résistantes. Cette étude inclura également 8 individus mâles et 8 individus femelles qui recevront un régime standard. Au cours d'un protocole, 40 souris seront utilisées. Les souris seront âgées d'au moins 8 semaines en début d'étude et les régimes donnés à partir de l'âge de 10 semaines, âges décrits dans la littérature pour ce genre d'expérimentation. Les variations importantes de poids et de composition corporelle induites par le régime alimentaire utilisés dans l'étude permettront d'établir un modèle prédictif robuste et de mieux normaliser les résultats des études faites chez la souris dans différentes conditions expérimentales. Les 20 souris dites « intermédiaires, ni sensibles ni résistantes » seront exclues de l'étude après trois semaines de régime, temps nécessaire et suffisant pour repérer les souris sensibles et résistantes aux régimes. Ces 20 souris génétiquement modifiées pourront être introduites dans une autre étude nécessitant des souris contrôles n'exprimant pas les récepteurs à ce neuropeptide. Cette autre étude nous permettra de respecter la règle des 3R. La conformité avec les exigences de remplacement, réduction, et raffinement sera prise en compte : 1) remplacement : ce projet s'inscrivant dans le cadre d'études précliniques visant à établir des recommandations nutritionnelles par l'étude d'adaptations comportementales et la

mesure de conséquences au niveau de l'équilibre énergétique de l'individu entier, les objectifs du projet ne peuvent être atteints sans recours à un animal modèle de l'Homme. ; 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. Par ailleurs, une grille d'évaluation des points limites précoces sera mise en place, qui lorsqu'ils seront atteints conduiront à l'euthanasie de la souris. Nous réaliserons des tests de glycémie à mi-parcours (6 semaines de régime) et à la fin (12 semaines de régime) de chaque étude sur les souris sensibles et résistantes. A la fin des expérimentations (12 semaines de régime standard ou gras et sucré), les animaux seront tous euthanasiés, le sang et différents organes seront prélevés afin d'identifier de nouveaux marqueurs et d'analyser les répercussions des régimes sur les souris sensibles ou résistantes. Les deux régimes offerts (standard et gras-sucré) sont appétents et ne provoqueront pas de stress ni de trouble dans le comportement alimentaire 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 et le milieu est enrichi), et des tests de glycémie seront réalisés. Afin de limiter le stress et la douleur ces procédures seront réalisées par des opérateurs expérimentés. 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.

16080 Les matrices multi-électrodes utilisées pour l'enregistrement extracellulaire de l'activité neuronale sont devenues des outils essentiels en recherche fondamentale ainsi que dans le domaine de l'ingénierie neuronale, pour le développement d'interfaces cerveau-machine visant à la restauration du mouvement volontaire et de l'indépendance fonctionnelle des patients paralysés.

Leur implantation se fait par abord chirurgical nécessitant un accès à la surface des gyrus cérébraux. Une fois implantée, la matrice permet d'enregistrer des signaux neuronaux.

Toutefois, du fait de leur configuration, les matrices ont à ce jour une utilisation restreinte à l'enregistrement des aires corticales accessibles sur la surface cérébrale et ne permettent pas d'accéder à l'activité d'aires localisées dans la profondeur des sillons. Cette limitation est particulièrement critique chez les modèles animaux circonvolués et plus encore chez l'homme qui présentent des cerveaux complexes avec un important degré de gyrification. Par exemple sur le versant visuel ou moteur, certaines aires sensorielles essentielles à la détection des mouvements sont localisées dans la profondeur au niveau des replis du cortex.

En conséquence, l'activité neuronale de ces aires corticales s'avère difficilement accessible pour le développement d'interfaces cerveau-machine visant à la restauration des mouvements de la main ou des informations visuelles.

Dans ce contexte général, le présent projet a pour objectif de démontrer la faisabilité de l'implantation de matrices multi-électrodes dans la profondeur des sillons corticaux et d'évaluer la viabilité de ces implantations en termes d'enregistrement de l'activité neuronale et étudier les dommages tissulaires.

Pour ce projet, les expériences seront réalisées chez 18 singes macaque rhésus dans le cadre d'une procédure sans réveil visant plusieurs objectifs :

- Réaliser sous anesthésie une dissection pour l'ouverture d'un sillon cortical pour permettre l'accès aux surfaces latérales du sillon.
- Implanter une ou plusieurs matrices multi-électrode sur l'une des surfaces latérales
- Proposer une variante en testant l'implantation d'électrodes flexibles dans la profondeur du cortex et dans la profondeur du sillon
- Contrôler l'activité neuronale mesurée à l'aide de la matrice
- Evaluer les dommages tissulaires consécutifs à l'implantation.

Les animaux seront prémédiqués et maintenus sous anesthésie générale et analgésie appropriée pendant toute la durée des expériences dans les standards des procédures hospitalières chez l'homme lors de neurochirurgies. L'ensemble des fonctions vitales sera mesuré contrôlé et garanti pendant toute

la procédure. L'utilisation du macaque rhésus se justifie du fait de la gyrfication complexe de son cerveau qui dispose d'aires sensorielles comparables à l'humain. Ce modèle ne peut être substitué par d'autres modèles animaux possédant un cerveau moins complexe ou par un modèle *in silico* (informatique) ne pouvant donner de réponses physiologiques comme un organisme vivant. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum assurant l'obtention de données stables et reproductibles sur plusieurs individus en tenant compte de la complexité de la procédure.

Remplacement : Il n'y a pas de remplacement possible dans ce projet. L'organisation cérébrale et la complexité du cerveau du singe macaque sont un élément clef de l'expérimentation portant sur des structures corticales analogues à celles existant dans le cerveau humain.

Raffinement : La procédure chirurgicale sera réalisée suivant un protocole d'anesthésie et d'analgésie approprié. Pendant toute la durée de la procédure les animaux bénéficieront de la surveillance des paramètres vitaux (fréquence cardiaque, SPO2, CO2, fréquence respiratoire, pression artérielle non invasive, température, ECG, pourcentage de sevoflurane inspiré et expiré, pression respiratoire) et seront sous fentanyl en infusion continue. L'animal sera sous couverture à air chaud et sous la surveillance continue d'une personne en charge de l'anesthésie.

Réduction : En l'absence de connaissance a priori sur les conséquences fonctionnelles de l'implantation des matrices dans les sillons cérébraux, nous avons limité le nombre d'animaux à 6 par groupes répartis en 2 sous-groupes (3 cortex moteur et 3 cortex visuel). Le chiffre de 3 est le chiffre minimal pour établir la faisabilité de la procédure et sa répétabilité pour obtenir des enregistrements électrophysiologiques exploitables

Ce projet s'engage dans la mesure du possible de réutiliser des animaux. Cette mesure ne se fera que dans un cadre très strict, avec l'avis exclusif du vétérinaire et sous la condition unique que l'animal est recouvert son état de bien-être, et pour éviter l'utilisation de nouveaux animaux. Cette décision sera en plus conjointement avec l'avis positif de la structure chargée du bien des animaux de l'établissement.

Les résultats obtenus dans cette étude seront essentiels pour déterminer la viabilité de ce type d'implantation pour la réalisation d'enregistrements chroniques réalisés chez l'animal éveillé et engagé dans une tâche comportementale.

16081 Les maladies neurodégénératives sont causées par la mort de neurones, ce qui affecte le fonctionnement du système nerveux de manière chronique et progressive. Selon le groupe de neurones affectés, les troubles qui en résultent affectent la motricité, la sensibilité, le langage, la mémoire, la perception, les capacités cognitives, etc. La progression de ces maladies est très variable ; et si les traitements disponibles améliorent parfois leurs manifestations cliniques, ils ne permettent pas de ralentir significativement la progression des lésions, la mort neuronale se poursuivant inexorablement. La ou les causes des maladies neurodégénératives restent inconnues, hormis certaines formes génétiques pour lesquelles l'anomalie responsable a été identifiée.

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus fréquente. Elle est caractérisée par des troubles de la mémoire et du comportement, ainsi que par une désorientation dans le temps et dans l'espace et frappe aujourd'hui 50 millions de personnes dans le monde, dont plus de 1 000 000 en France. Son incidence (nombre de nouveaux cas par unité de temps, l'année en général, pour 100 000 habitants) augmente très fortement avec l'âge (de 1,5 % de la population âgée de 65 ans, elle double tous les ans pour atteindre 30 % dans la tranche des 80 ans et plus).

Le manque de médicaments efficace contre la maladie représente un défi majeur pour la santé humaine. Le développement de nouveaux modèles animaux de la maladie d'Alzheimer est nécessaire pour promouvoir la recherche et développement de candidats médicaments pour cette maladie.

L'objectif de ce projet est de développer et valider un modèle de souris pour la maladie d'Alzheimer, basé sur l'injection stéréotaxique du peptide amyloïde. Ce peptide est directement mis en cause dans la progression de la maladie chez les patients. La mise au point de ce modèle servira à tester des médicaments neuroprotecteurs potentiels capables de diminuer la toxicité du peptide amyloïde.

À cette fin, le nombre estimé de souris utilisées sera de 360, au maximum, afin de constituer plusieurs groupes expérimentaux, et de déterminer les meilleures conditions expérimentales (concentration de

peptide amyloïde, cinétique de l'apparition des symptômes, types de mesures de comportement). L'étude est construite avec 3 procédures, dont deux conditionnelles. Le nombre d'animaux pourra être réduit en fonction de la réussite des procédures 1 et 2.

Au cours de ce projet, une attention particulière sera apportée au respect de la règle des trois Rs.

Pour le Remplacement : Pour les raisons mentionnées dans la section "justification de l'utilisation des animaux", il ne sera pas possible de remplacer cette étude des stratégies *in vitro* et/ou *in silico*. Brièvement, la maladie d'Alzheimer implique l'interaction de plusieurs types cellulaires et plusieurs structures cérébrales, qui ne peuvent pas être reproduite *in vitro* ou *in silico*.

Pour la Réduction : Le nombre de souris (n par expérience) sera optimisé pour assurer l'obtention de résultats statistiquement significatifs. À cette fin, des études antérieures disponibles dans la littérature scientifique suggèrent un nombre minimal de 10 souris par groupe, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs en termes de (i) % de neurones morts (neurodégénérescence), et (ii) détérioration des fonctions cognitives se traduisant par une perte de mémoire spatiale ; deux caractéristiques essentielles et déterminantes dans la patho-physiologie de la maladie d'Alzheimer.

Pour le Raffinement : nous inclurons des procédures visant à améliorer le bien-être des animaux, en nous basant sur: (i) la présence d'objets d'enrichissement, (ii) des stratégies d'analgésies pré, pendant et après l'opération, (iii) et le contrôle strict des besoins physiologiques des animaux (température corporelle) pendant et après l'opération (pour assurer un rétablissement rapide). Les animaux seront hébergés par deux au minimum (5 au maximum), en cages ventilées, avec accès ad libitum à l'eau et à la nourriture.

Ce projet expérimental permettra de développer un modèle animal de la maladie d'Alzheimer afin de tester de nouveaux candidats médicaments pour cette incurable maladie.

16082 Le trouble du spectre de l'autisme (TSA) est un trouble neurodéveloppemental hétérogène caractérisé principalement par deux symptômes comportementaux (principaux) prédominants, notamment une altération de la communication sociale et des comportements limités ou répétitifs.

La souris BTBR est l'un des modèles de rongeurs les plus utilisés pour les TSA idiopathiques. BTBR est une souche consanguine de souris qui présente des déficits bien reproduits avec une validité apparente élevée pour les principaux symptômes de l'autisme, à savoir des déficits sociaux et des niveaux élevés de toilettage automatique répétitif, sans anomalie générale de la santé ou des capacités physiques.

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 aiguë ou chronique d'agents pharmacologiques à des souris transgéniques BTBR dans une batterie de tests comportementaux. Il s'agit également de réaliser des prélèvements permettant le dosage 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 d'agents pharmacologiques à tester.

Une étude standard comprend 96 animaux. Des études préliminaires ont permis de déterminer le nombre d'animaux par groupe pour lequel les résultats présentaient une robustesse suffisante :

- 4 groupes de 12 souris C57Bl/6 qui reçoivent le produit testé à 3 doses et un placebo
- 4 groupes de 12 souris BTBR qui reçoivent le produit testé à 3 doses 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 de produits testés par an est de 10.

Le nombre total maximum de souris utilisées sur 5 ans est de 4800. (96 animaux/étude x études/an x 5 ans)

Respect de la règle des 3 R :

- 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 3 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 souffrances 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 ayant un degré de sévérité inférieur permettant d'obtenir des informations équivalentes à celles obtenues par le présent modèle.

16083 Ce projet permet de vérifier l'efficacité de candidats médicaments en utilisant des modèles de pharmacologie chez le rongeur, sur la perte d'audition, la cécité et les troubles neuromoteurs.

Les troubles sensoriels et moteurs sont des indications pour lesquelles aucune solution thérapeutique satisfaisante n'existe à ce jour. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 10 millions des personnes sont atteintes d'un ou plusieurs troubles sensoriels et/ou neuromoteurs, par exemple les déficiences auditives toucheraient aujourd'hui 15% de la population mondiale et plus de 30 millions d'Américains souffrent d'un certain type de neuropathie périphérique. Même si la plupart de ces désordres ne sont pas mortels, l'impact sociétal est majeur, pouvant entraîner chez les malades, isolement social, handicap et dépression. La recherche de thérapies pour le traitement des désordres sensoriels et moteurs est très active, mais les expertises en matière de développement de médicaments incluant les modèles animaux et la mise en œuvre d'une recherche dite « translationnelle » font sévèrement défaut. C'est le contexte dans lequel s'inscrit ce projet qui consiste à générer chez le rongeur, au travers des mêmes causes que celles observées chez l'homme, de la surdité, la cécité ou des désordres neuromoteurs pour vérifier l'efficacité de principes actifs et permettre leur passage en phase clinique chez l'homme.

Le nombre d'animaux à utiliser dans ce projet est dépendant du nombre de candidats médicaments à tester par an. On l'estime à un maximum sur 5 ans de 1350 souris, 300 rats et 210 cobayes.

Le projet s'établit selon la règle des 3 R :

Réduire : Le choix des procédures expérimentales à mettre en œuvre dans le projet tient compte de l'état de l'art et des conseils de scientifiques, experts internationalement reconnus dans le domaine sensoriel et moteur. Le nombre de procédures expérimentales est limité aux seules expériences considérées comme indispensables pour démontrer l'efficacité d'un principe actif sur les troubles sensoriels et moteur. Toute expérimentation a fait l'objet d'un calcul de N permettant de définir un nombre d'animaux pour mesurer de manière statistiquement représentative une efficacité.

Raffiner : Les animaux sont pris en charge par des personnes ayant toutes les qualifications pour exercer dans le domaine de l'expérimentation animale. Ils font l'objet d'un suivi quotidien et bénéficient de mesures d'enrichissement social et de leur milieu. Toutes les mesures fonctionnelles, sont réalisées sous anesthésie et analgésie pour réduire au maximum l'inconfort, la douleur et l'angoisse des animaux. La priorité est donnée aux procédures non invasives Dans tous les cas, des points limites ont été définis pour aider à la décision face à une situation « critique ».

Remplacer : L'analyse de l'état de l'art de la Recherche préclinique dans le domaine sensoriel et moteur montre que l'utilisation des modèles rongeurs est la seule alternative pour tester l'efficacité des principes actifs avant leur administration chez l'homme. Une veille technologique continue permet de

rester vigilant sur l'arrivée de nouvelles techniques qui viendraient se substituer à l'expérimentation animale.

16084 La Directive Cadre Européenne sur l'eau fixe le bon état écologique des cours d'eau et la libre circulation des espèces piscicoles. Les propriétaires d'ouvrages transversaux doivent ainsi se mettre en conformité en équipant ou effaçant leur(s) ouvrage(s). Certains maîtres d'ouvrage sont tenus (ou décident volontairement) d'évaluer l'efficacité de ces actions en mettant en place des suivis des comportements des poissons aux abords des ouvrages, avant et/ou après restauration. La présente étude consiste à suivre l'efficacité d'une passe à poissons aménagée au niveau d'un barrage sur un grand fleuve. S'agissant d'une passe dite « multi-espèces », elle a pour objectif d'être fonctionnelle pour toutes les espèces aquatiques susceptibles de coloniser le fleuve.

L'outil RFID est de plus en plus couramment utilisé pour quantifier ces comportements. En effet, il permet de mesurer la proportion d'individus qui cherchent à migrer vers l'amont et ceux qui parviennent effectivement à franchir l'obstacle (détection en amont de celui-ci). Il faut pour cela procéder au marquage d'un nombre important d'individus à l'aide de micro-puces RFID à identifiant unique appelées PIT tags et équiper les ouvrages ou obstacles à l'aide d'antennes de détection reliées à un lecteur-enregistreur. Le suivi des poissons marqués est ensuite réalisé sur une période d'une année minimum.

Afin d'évaluer l'efficacité de la passe à poissons pour les différentes espèces identifiées, un suivi par marquage-détection est réalisé dès 2019 à l'aide de PIT tags implantés sur 7 espèces cibles : barbeau fluviatile, chevaine, hotu, brèmes, ablette/spirlin, anguille européenne. En plus des 7 espèces ciblées en 2019 ; 5 espèces supplémentaires seront ajoutées dès 2020 suite aux premiers résultats du suivi : le gardon, le rotengle, le brochet, le goujon et le silure glane. Ces 12 espèces sont naturellement présentes dans le fleuve étudié. La passe à poissons est équipée d'antennes de détection placées, à l'entrée et à la sortie, ce qui permet le suivi à distance des poissons marqués en transit par la passe.

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 poissons sont capturés chaque année au printemps par filets maillants, filets verveux "cerfs-volants" ou pêches électriques de bordure et en bateau. D'ici 2024, un total de 6800 poissons sera marqué par implantation d'un PIT tag 12 ou 23 mm, à raison de 50 à 400 individus par espèce et par année et répartis en fonction de leur capturabilité. Il s'agit d'un minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population, tout en limitant au maximum les atteintes sur les populations (Règle des 3R : Réduction). En effet, seule une fraction minoritaire des individus va migrer, l'autre fraction est résidente et ne sera pas détectée. Les marques PIT tags 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 à proximité du lieu de capture (règle des 3R : Raffinement).

16085 La maladie carieuse est une pathologie fréquente, au coût biologique et économique extrêmement lourd. Dans les situations de caries profondes, la pulpe subit une agression bactérienne sévère, qui produit une inflammation et la destruction des cellules pulpaires. Lorsque les capacités de réparation du complexe pulpo-dentinaire sont considérées dépassées, l'objectif thérapeutique est alors d'éliminer la totalité du parenchyme pulpaire en voie de nécrose ou nécrosé, de désinfecter le compartiment pulpaire et de l'obturer de manière étanche pour prévenir la recontamination bactérienne. Ce traitement nécessite un délabrement tissulaire conséquent qui fragilise l'organe dentaire et le prive de ses fonctions physiologiques et de défense vis-à-vis des agressions. A long terme, ce traitement rend la dent plus fragile et sujette aux fractures.

D'un point de vue physiopathologique, avant la destruction complète de la pulpe, il existe une réponse tissulaire, ayant pour objectif de préserver la fonction pulpaire, en synthétisant un tissu cicatriciel appelé dentine de réparation. Ce processus de réparation dépend de l'état inflammatoire initial du tissu. De nouveaux matériaux bio-actifs à base de silicates tricalciques peuvent aider la pulpe à la formation de cette barrière cicatricielle, mais à ce jour ils n'ont pas encore été évalués en condition inflammatoire, et leurs mécanismes d'actions biologiques ne sont pas encore bien connus.

Le but de notre étude est d'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques intervenant dans l'inflammation et la réparation tissulaire. L'objectif final est de proposer de nouvelles alternatives thérapeutiques moins invasives chez l'homme.

Dans cette étude, nous proposons d'étudier la réparation pulpo-dentinaire chez le rat après avoir induit une inflammation pulpaire avec des LPS (lipopolysaccharides). Après la mise en place de cette pulpite (inflammation pulpaire), une pulpotomie (élimination de l'ensemble de pulpe située dans la chambre pulpaire et son remplacement par un ciment à base de silicate tricalcique) est réalisée. La réparation de la pulpo- dentinaire après l'induction de la pulpite sera étudiée dans un premier temps par analyse radiographique puis dans un deuxième temps par analyse histologique, immunohistologique après mise à mort des animaux.

Pour ce projet qui devrait durer 3 ans, un nombre maximum de 460 rats est prévu dans le respect de la règle des « 3R ». En effet, 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. Notre étude sera réalisée sur le rat. En effet, la complexité du système à étudier et son impossibilité à être reproduit *in vitro*, en tenant compte de tous les phénomènes biologiques de l'organisme (réponse du système immunitaire, vascularisation et innervation du tissu régénéré notamment), font qu'il n'y a aucune méthode alternative qui pourrait se substituer à l'utilisation des animaux. Nous travaillons particulièrement sur la molaire de rat car il a été montré que les réponses biologiques y étaient comparables à celles de la dent humaine. Ce modèle animal semble pertinent et a été décrit comme supérieur aux modèles canin et simien, même s'il présente des inconvénients inhérents à sa petite taille.

De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse ressenties par les 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.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes inflammatoires conduisant à la destruction tissulaire de la pulpe et d'évaluer la capacité des ciments à base de silicate tricalcique à moduler cette inflammation.

16086 CADASIL est une forme héréditaire de maladie des petits vaisseaux cérébraux, qui se manifeste vers l'âge de 45 ans par la survenue d'accidents vasculaires cérébraux à répétition et de troubles cognitifs. La maladie évolue vers une démence et le décès prématuré du patient vers l'âge de 60-65 ans car il n'existe aucun traitement préventif ni curatif. CADASIL est causée par des mutations très stéréotypées dans le gène Notch3, qui conduisent à l'accumulation anormale de la protéine Notch3 dans la paroi des vaisseaux, à la dysfonction des vaisseaux cérébraux, puis aux lésions du cerveau. La complexité des interactions "vaisseaux –cerveau–débit sanguin" fait qu'on ne sait pas modéliser la maladie CADASIL *in vitro*. En revanche, nous disposons de modèles de souris génétiquement modifiées qui récapitulent la phase pré-symptomatique de la maladie CADASIL, c'est-à-dire qui développent l'accumulation anormale de la protéine Notch3 et la dysfonction des vaisseaux cérébraux mais ne présentent pas de symptômes neurologiques. Dans une étude preuve de concept, nous avons montré que des injections intrapéritonéales (IP) hebdomadaires répétées d'un anticorps dirigé contre la protéine Notch3 étaient capables de prévenir l'apparition de la dysfonction vasculaire dans un de ces modèles souris.

Les 3 objectifs de cette étude sont : 1) d'élucider le mécanisme d'action de l'anticorps, 2) de confirmer ces résultats dans 2 autres modèles souris de la maladie qui expriment une protéine mutée ayant des caractéristiques différentes et de 3) de tester le potentiel thérapeutique de cet anticorps lorsqu'il est administré alors que la dysfonction des vaisseaux cérébraux est présente.

Le nombre total maximal de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 560 pour une durée de 4 ans.

Ce projet met en jeu des injections IP hebdomadaires répétées d'anticorps chez 400 souris et une unique injection d'anticorps dans la grande citerne du cerveau chez 160 souris. Nous étudierons la dysfonction des vaisseaux cérébraux et l'expression de Notch3 avec des approches de biochimie et d'immunomicroscopie électronique dans les vaisseaux du cerveau prélevés après la mise à mort de la

souris. Pour réduire le nombre d'animaux, l'analyse de la dysfonction des vaisseaux et les études biochimiques seront réalisées sur les mêmes souris. Les études seront réalisées de façon séquentielle : s'il s'avère que l'anticorps ne montre pas d'efficacité thérapeutique dans les 2 autres modèles, alors nous n'étudierons pas son mécanisme d'action dans ces 2 modèles. Enfin, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce au jeu de données collectées au cours d'expériences précédentes. Pour réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, le site d'injection intrapéritonéal sera alterné. L'injection dans la grande citerne du cerveau sera réalisée sous anesthésie générale et analgésie pré, per et postopératoire. 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 conduire à terme à la réalisation d'essais cliniques chez l'homme.

16087 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique représente un problème majeur de santé publique en France et dans le monde. A ce jour, les agents anti-plaquettaires qui préviennent la thrombose artérielle, c'est-à-dire la formation d'un agrégat composé de plaquettes notamment au niveau des coronaires, ne peuvent pas être utilisés dans le traitement de l'AVC en raison de la dangerosité du saignement qu'ils pourraient entraîner au niveau du cerveau. L'identification de nouveaux médicaments antiplaquettaires prévenant la formation de thrombi et ayant très peu d'effets sur l'hémostase constituerait une nouvelle approche pour le traitement de l'AVC.

Afin de limiter au maximum le risque d'effets secondaires lors du développement de nouveaux médicaments anti-thrombotiques, nous nous sommes intéressés à un récepteur exprimé uniquement sur les plaquettes sanguines. Le ciblage de ce candidat a démontré une efficacité en thrombose expérimentale chez la souris, sans en modifier l'hémostase. Ces études reposaient sur l'utilisation d'un anticorps spécifique, qui a depuis été humanisé. Cet agent est en cours d'évaluation en phase 1 chez l'homme. Pour une évaluation en phase 2, les neurologues souhaitent des données chez la souris dans un modèle de thrombose cérébrale.

Le but de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'effet du ciblage d'un récepteur plaquettaire sur le saignement intracrânien dans un modèle d'AVC, et de le comparer à l'effet sur le saignement intracrânien des traitements antiagrégants classiquement utilisés.

Un seul modèle d'AVC sera utilisé. Il consiste à réaliser une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne chez l'animal. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir étudier l'effet de l'agent bloquant sur les saignements intracrâniens.

En cas de résultats positifs, les molécules évaluées pourraient être utilisées dans des essais cliniques chez des patients. Cette stratégie permettrait d'améliorer le traitement de l'AVC sans augmenter le risque hémorragique et donc de limiter la mortalité et les risques d'handicap liés à l'AVC.

Limitation du nombre d'animaux :

Remplacement : Le but de ce projet est d'évaluer l'intérêt de cibler un récepteur des plaquettes dans l'AVC. Ce processus étant particulièrement complexe et faisant intervenir plusieurs types cellulaires ainsi que des conditions hémodynamiques (vaisseau, pression artérielle, flux sanguin), il est impossible de substituer la souris par des modèles *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum, avec la contrainte d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour chaque expérience, permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour cela, des données d'imagerie par IRM seront réalisées et seront en complément d'analyses histologiques sur une même expérience, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

De plus, nous utiliserons des tests statistiques adaptés à nos expériences : nous procéderons à une analyse de variance via un test Kruskal-Wallis puis à un post-test Bonferroni.

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 afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux
 - Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C afin lutter contre l'hypothermie pendant la chirurgie.
 - Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération.
 - Injection d'analgésique et/ou d'anti-inflammatoire pendant et après chaque procédure.
- Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.
 Cette étude nécessitera au maximum l'utilisation de 270 + 96 souris = 366 souris.

16088 Les tiques sont des arthropodes de la famille des arachnides qui sont vectrices d'un grand nombre de maladies. Parmi elles, on retrouve la borréliose de Lyme, pouvant avoir des complications neurologiques ou encore la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (FHCC), avec des taux de létalité allant de 10 à 40%.

Le virus de la FHCC est un virus de la famille des Nairovirus et est endémique en Afrique et en Europe du Sud. Les espèces de tiques qui le transmettent sont donc des espèces propres au climat local. Cependant, avec la problématique grandissante du réchauffement climatique, les climats en Europe changent et se rapprochent de plus en plus d'un climat où le virus FHCC peut se transmettre. Déjà présente en Corse, la tique *Hyalomma marginatum* se propage en Europe rapidement. Pour l'instant importé par la tique *Hyalomma marginatum*, le virus s'étend là où la tique se propage. Cependant, si la transmission de ce virus pouvait être assurée par des tiques très présentes en Europe, alors le nombre de cas pourrait croître à une vitesse supérieure à celle actuelle.

Ce virus étant très pathogène pour l'Homme, nous avons décidé d'étudier 2 virus moins pathogènes de la même famille afin d'étudier leur transmission : les virus Dugbe et Hazara. Ainsi, en étudiant la possible transmission de ces virus par des tiques des régions tempérées, très répandues en France et en Europe, chez des souris, nous serions capables de déterminer si oui ou non ces tiques seraient susceptibles de transmettre le virus FHCC en Europe.

Pour ce faire, nous allons dans un premier temps infecter des souris directement par les deux virus par voie sous-cutanée. Nous suivrons alors la virémie de manière quotidienne afin d'en déterminer le pic. Dans un second temps, nous mettrons les souris infectées en contact avec des tiques quelques jours avant ce pic afin qu'elles aient le temps de se fixer et qu'elles soient en période de gorgement durant ce pic de concentration des virus. Cela permettra aux tiques de s'infecter pour pouvoir transmettre le virus par la suite. Enfin, nous placerons les tiques infectées sur de nouvelles souris saines afin d'étudier si le virus peut se transmettre aux souris par la voie vectorielle. Nous disséquons finalement les souris afin d'étudier l'état de l'infection. Les tiques seront également disséquées.

Ce projet nécessitera d'utiliser 4270 souris pendant 5 ans qui seront incluses dans 3 procédures de sévérité modérée.

Respect des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Les études réalisées *in vitro* ne permettent pas actuellement de rendre compte de la complexité des interactions dans le cadre de la transmission d'une maladie par un vecteur à un hôte sensible. Il est donc nécessaire de se rapprocher des conditions naturelles de transmission en utilisant un modèle animal adapté. La souris est un modèle intéressant car il a déjà été montré qu'elle est sensible à l'infection par plusieurs virus de la famille du virus CCHF.

L'utilisation de points limites nous permettra de mettre à mort les souris avant l'apparition d'une souffrance importante. Les résultats obtenus dans la procédure 1 dans laquelle plusieurs lignées de souris seront testées permettront de mieux définir les symptômes et de sélectionner la lignée de souris la mieux adaptée à l'infection des tiques dans le cadre de la procédure 2.

Après analyse du projet par les statisticiens, il s'avère que l'approche est exploratoire, en l'absence de connaissances précises dans le domaine. Elle aura donc pour objectif de mettre en évidence des effets expérimentaux assez forts à très forts. Des études statistiques adaptées aux petits échantillons (Tests de type Kruskal Wallis avec corrections de Bonferroni) seront appliquées dans le cadre de la première

procédure afin d'identifier la ou les lignées les plus pertinentes en termes de durée de virémie, lesquelles seront utilisées dans le cadre de la procédure 3. La variable dose d'injection sera appréhendée comme une variable qualitative. Dans ce cadre, deux répétitions (deux cages) par dose d'injection se justifient pleinement afin d'éviter la confusion statistique des effets "cage" et "dose". La procédure 2 devrait permettre de montrer des variations assez fortes du succès d'infection (par exemple, une variation de 20% à 50% du succès d'infection). Dans le cadre de la procédure 3, le manque possible de puissance lié à l'utilisation de variables binaires (1/0) sur des effectifs assez faibles, sera étayé par des quantifications (de type qPCR) complémentaires.

L'état de santé des souris sera surveillé de façon régulière, notamment dans les procédures incluant des animaux immunodéprimés ce qui permettra de détecter précocement tout signe de souffrance et l'atteinte éventuelle des points limites. De la nourriture semi-liquide sera mise à disposition des souris en cas de prostration ou dès lorsqu'une gêne même légère à la motricité sera observée.

16089 Si l'obésité est un réel problème de santé publique, générant une diminution de l'espérance de vie en raison des maladies qu'elle entraîne (hypertension, cancers, diabètes ...), elle est également associée à des déficits de mémoire. C'est d'autant plus problématique pendant l'enfance et l'adolescence qui représentent des périodes critiques de maturation de certaines structures du cerveau indispensables pour la mémoire, comme l'hippocampe. Notre équipe a récemment mis en évidence chez la souris que la consommation d'une nourriture hyperlipidique (HL) pendant l'adolescence, en plus d'entraîner l'obésité, entraîne des déficits mnésiques à l'âge adulte.

L'objectif du présent projet est de déterminer dans quelle mesure l'exposition à un régime obésogène à l'adolescence pourrait à court terme entraîner à l'âge adulte des déficits de mémoire transitoires qui disparaîtraient après un retour à un régime normal, tout en induisant à plus long terme une vulnérabilité au déclin cognitif lié à l'âge.

Pour cela des souris seront exposées pendant 12 semaines, à partir du sevrage, à une nourriture HL ou standard avant de réaliser à différents âges des tests comportementaux simples permettant d'évaluer l'impact de ce régime sur la mémoire, en étudiant une possible vulnérabilité cognitive apparaissant avec l'âge.

Ce projet visant à étudier les effets de la nutrition sur des aspects comportementaux et de fonctionnement cérébral sollicite plusieurs tests comportementaux, dont un modèle comportemental en labyrinthe radiaire qui permet de modéliser chez la souris un type de mémoire atteint au cours du vieillissement normal et pathologique. L'étude est permise grâce à l'utilisation du modèle de rongeur soumis à de la nourriture hyperlipidique et il n'est pas possible de le remplacer par des approches cellulaires notamment car 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.

En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et permettre des comparaisons statistiques fiables, nous estimons que 15 souris par groupe seront nécessaires pour mener à bien le projet. Cela représente un total de 360 souris sur 4 ans. Ces expériences pouvant s'étaler sur des périodes temps relativement longues, dans un souci de bien-être animal, les souris 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, 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. Dans l'ensemble, ces expériences devraient permettre une meilleure compréhension des effets d'une nourriture HL sur le cerveau et la mémoire en identifiant certains mécanismes afin d'envisager potentiellement à plus long terme des stratégies thérapeutiques.

16090 La dermatite atopique, encore appelée eczéma atopique, est une des maladies les plus fréquentes de l'enfant qui peut apparaître dès les premiers mois de la vie.

C'est une maladie inflammatoire chronique de la peau. Elle débute le plus souvent vers l'âge de trois mois, mais peut également s'observer dès les premiers jours de la vie. Chez le nourrisson les lésions de la peau s'observent sur les joues et le menton, les cuisses, les bras et l'abdomen.

Les lésions évoluent progressivement ou simultanément sous la forme de rougeurs, de démangeaisons, de vésicules puis de croûtes.

L'origine de cette pathologie est principalement allergique.

Il n'existe pas de traitement curatif efficace à ce jour. Les traitements utilisés sont symptomatiques et permettent de réduire les signes cliniques.

Il est donc important d'avoir un modèle préclinique pertinent permettant de tester l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques. Il est indispensable de tester ces molécules dans ce modèle pour plusieurs raisons :

- Il n'existe pas de modèle *in vitro* de dermatite atopique pouvant remplacer complètement la peau en tant que tissu biologique vivant. Il existe cependant des modèles *in vitro* qui permettent d'effectuer un premier criblage d'efficacité de molécules, mais cette efficacité doit ensuite être confirmée chez l'animal.

- Ces modèles *in vitro* ne permettent pas de tester des produits thérapeutiques ou des dispositifs médicaux destinés à être appliqués sur la peau (voie dermique / topique)

- L'efficacité ne pouvant être complètement testée *in vitro*, 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)

Ce projet s'effectuera chez la souris (*Mus musculus*).

Il est prévu d'utiliser 500 souris sur une période de 5 ans pour permettre l'évaluation de l'efficacité de molécules pharmaceutiques ayant une indication thérapeutique dans le traitement la dermatite atopique.

La règle des 3Rs sera appliquée à ce projet selon les modalités suivantes :

- Remplacement des animaux d'expérience : L'utilisation du modèle animal de dermatite atopique ne sera utilisée qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *in vitro*.

- Réduction des 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 : Evaluation de points finaux tous les jours (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, état des lésions induites), enrichissement du milieu dans les cages (igloo, coton et bûchette de bois).

Des mesures ont été établies en concertation avec le Comité de Suivi du Bien Être Animal (SBEA) de notre établissement afin de réduire la douleur pendant les procédures expérimentales (anesthésie, analgésie, points limites adaptés, etc...)

16091 Les cancers du poumon représentent la cause principale des décès dus à des néoplasies en France et dans le monde. Dans 85% de cas, il s'agit de Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules (CBNPC), correspondant essentiellement aux adénocarcinomes et aux carcinomes à grandes cellules. Les patients atteints de CBNPC présentent des aberrations génétiques qui touchent souvent des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor, 15%), ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase, 5%) ou encore MET (5%). Ces mutations entraînent généralement des activations constitutives de voies contrôlant la survie et la prolifération cellulaire. Ces mutations oncogéniques constituent ainsi des cibles thérapeutiques de choix utilisées pour le développement d'inhibiteurs actuellement prescrits en clinique en première ligne pour traiter ces patients. Malheureusement, après une phase initiale de réponse à ces thérapies ciblées, on assiste inexorablement à une récurrence du cancer.

L'objectif de notre projet est d'identifier de nouvelles combinaisons d'inhibiteurs utilisés en thérapie, capables de prévenir la survenue de la résistance de cancer lié à des mutations de l'EGFR. En effet, nous avons récemment développé une approche permettant de générer de nouveaux modèles cellulaires de résistance du cancer bronchique à la thérapie ciblée, et notamment aux inhibiteurs du récepteur EGFR. En utilisant des lignées cellulaires humaines dérivées de ce type de tumeur, nous avons obtenu des résultats encourageants *in vitro*, montrant que certains composés permettent de réduire fortement la progression des cellules résistantes aux inhibiteurs d'EGFR. Afin de confirmer ces résultats dans un modèle expérimental plus proche du patient, nous testerons les effets *in vivo* de ces composés en utilisant des souris immunodéficientes dans lesquelles les cellules humaines de cancer bronchique seront injectées en sous-cutané afin de reproduire la formation et la progression des tumeurs. Le modèle murin est le plus approprié pour étudier la tumorigenèse qui nécessite des interactions complexes ne pouvant être récapitulées *in vitro*.

Dans ce projet, le respect de la règle des 3R se traduit par :

Remplacer : l'utilisation des animaux est indispensable pour confirmer *in vivo* l'efficacité des combinaisons d'inhibiteurs identifiées *in vitro* sur les lignées humaines. Dans le protocole présenté ici, la souris est utilisée comme modèle préclinique obligatoire avant toute évaluation chez l'Homme.

Réduire : le projet nécessite un nombre estimé maximal de 1116 souris sur une durée de 5 ans. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

Raffiner : les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi et suivis quotidiennement afin de veiller à leur bien-être. L'utilisation d'anesthésiques et analgésiques sera préconisée lors de l'expérimentation afin d'éviter le stress et la souffrance de l'animal, et les points limites fixés préalablement seront respectés.

16092 Les plaquettes sanguines permettent l'arrêt du saignement lors d'une blessure et joue un rôle important dans le développement de maladies cardio-vasculaires (première cause de mortalité dans les pays industrialisés). Un moindre défaut de leur production ou de leur activation peut avoir des conséquences soit hémorragiques soit d'occlusion de vaisseaux amenant à des accidents vasculaires cérébraux ou des infarctus du myocarde. Ainsi, l'avancée des connaissances dans la biologie des plaquettes est indispensable. Ce projet vise à étudier le rôle de protéines de la signalisation et de canaux calciques dans la production et l'activation des plaquettes sanguines et de comprendre comment des mutations de ces protéines modifient les capacités thrombotiques des plaquettes. Pour cela, nous disposons de modèle de souris génétiquement modifiées qui portent les mêmes mutations que celles retrouvées chez l'homme dans des conditions pathologiques.

Le nombre de souris estimé pour cette étude sur 2 ans est de 208 animaux maximum avec 4 procédures expérimentales. De la naissance à la mort, les souris sont hébergées et expérimentées selon les conditions de la directive européenne régies par les principes de remplacement, de réduction et de raffinement (Règle des 3 R). Le recours au modèle murin est irremplaçable pour deux raisons majeures: (i) la complexité des mécanismes mis en jeu dans un contexte physiopathologique intégré de vieillissement ne sont pas modélisables par des approches *in vitro* et (ii) l'utilisation des modèles de souris génétiquement modifiées de modélisation de pathologies humaines.

Seulement, le nombre d'animaux sera réduit au maximum (i) en suivant des protocoles expérimentaux établis dans le laboratoire et en tenant compte d'expériences déjà réalisées qui nous ont montré que nous pouvons obtenir des résultats statistiquement corrects en faisant des groupes de 4 -24 souris selon la procédure réalisée, (ii) en limitant aux seules expériences considérées comme absolument indispensables en fonction des résultats obtenus au cours du projet et (iii) en évitant la répétition d'études antérieures. Les approches statistiques utilisées pour déterminer les effectifs et pour analyser les résultats obtenus sont le test de Student non apparié à deux variables, le test 1-way-ANOVA suivi d'un post-test sur les moyennes (Tukey) ou le 2-Ways-ANOVA suivi d'un post-test sur les moyennes (Bonferroni). Pour le raffinement, les souris ont un accès illimité à la nourriture et boisson avec du papier sopalin, du carton et/ou des cubes de bois dans la cage et une observation quotidienne des souris est réévaluée par les zootechniciens. Toutes les procédures expérimentales se feront sous

anesthésie et analgésie avec un contrôle permanent de l'état d'anesthésie par les expérimentateurs. La douleur et souffrance des animaux sera évitée par une surveillance des animaux de la naissance à la mort et pendant toutes les procédures expérimentales, et une mise à mort rapide de la naissance à la mort ou lors d'une procédure expérimentale sera effectuée si l'animal montre des signes de détresse et souffrance (prostration, perte de poids conséquentes, grosses plaies/blessures) par dislocation cervicale avec anesthésie/analgésie au préalable.

16093 L'athérosclérose constitue un problème de santé publique majeur puisqu'elle est 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.

Son développement est initié par une accumulation excessive de cholestérol au sein des vaisseaux sanguins, aboutissant à une plaque d'athérome, dont la rupture peut provoquer le blocage d'un vaisseau, entraînant un événement cardiovasculaire. L'action athéroprotectrice des lipoprotéines de haute densité (HDL) est attribuée à leur rôle central dans le transport retour du cholestérol et aux effets qu'elles exercent sur la paroi vasculaire.

Plusieurs récepteurs contribuent à l'action athéroprotectrice des HDL, comme le montrent des résultats obtenus principalement sur des modèles cellulaires. Ce projet s'intéresse à l'étude *in vivo* du rôle de ces récepteurs, en fonction de nos précédentes observations *in vitro*. Il implique l'utilisation de modèles murins. Nous effectuerons des mesures relatives au métabolisme entéro-hépatique du cholestérol et évaluerons le développement de l'athérosclérose chez des animaux placés dans des conditions physiologiques (régime normal) et physiopathologiques (régime hypercholestérolémique).

Des mesures seront intégrées pour respecter la règle des 3R. Des efforts seront notamment portés pour réduire le nombre d'animaux par groupe et, 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. De plus, les animaux seront hébergés dans des locaux parfaitement adaptés (Zootechnie de Ranguéil) et soignés par un personnel qualifié qui veillera à leur bien-être (enrichissement dans les cages, surveillance quotidienne...). Concernant le raffinement, des mesures seront mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales, notamment par l'utilisation de méthode d'anesthésie et d'analgésie. Dans le cadre de cette règle, et afin de mener à bien ce projet de recherche, nous estimons un besoin total de 2325 animaux.

Afin de respecter la démarche scientifique, les résultats obtenus seront soumis à des tests statistiques (test de Student ou ANOVA selon le nombre de groupes comparés). Les résultats obtenus constitueront un appui de recherche fondamentale permettant d'évaluer l'importance de l'activité de ces récepteurs, et leurs contributions respectives, dans le métabolisme des HDL et l'athéroprotection.

16094 La mémoire est une fonction cognitive indispensable à la réalisation de nos activités quotidiennes et qui permet l'élaboration progressive de notre propre identité. L'altération de cette fonction est retrouvée dans de nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques (maladie d'Alzheimer, schizophrénie, dépression etc.) et engendre des troubles fortement invalidants. Les stratégies thérapeutiques développées grâce à des expériences sur des animaux s'avèrent souvent inefficaces lors de leur passage à l'homme. La difficulté de transposer à l'Homme les données obtenues chez l'animal pourrait être liée à des méthodes d'évaluation très différentes des déficits de mémoire. En effet, chez l'homme, le Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB) est généralement utilisé pour évaluer les performances cognitives. Il s'agit d'un ensemble de tests cognitifs automatisés présentés aux patients sur un écran tactile. Il permet de mesurer différents paramètres (la mémoire visuelle, la mémoire de travail, l'attention, la planification...) dans le but d'établir un profil cognitif individuel. Un équipement similaire a été élaboré dans l'objectif d'adapter les tests du CANTAB aux rongeurs. Il comprend des écrans tactiles permettant d'effectuer un ensemble de tests automatisés pour évaluer les performances cognitives de l'animal. Cette méthode d'évaluation présente l'avantage de se rapprocher des conditions cliniques, mais, il manque encore des données en faveur de l'utilisation de cette méthode chez les rongeurs.

Ce projet de recherche vise à mettre au point un protocole expérimental permettant de caractériser les performances de mémoire chez deux espèces de rongeurs, la souris et le rat. Concernant la souris, cette mise au point sera faite sur des souris saines et sur deux modèles de souris génétiquement modifiées (l'une modèle de maladie d'Alzheimer, la souris 5XFAD et, l'autre modèle de schizophrénie, la souris SRKO). Concernant le rat, les animaux utilisés seront issus de deux souches différentes. D'une part la souche appelée Wistar, albinos, souche la plus couramment utilisée dans la modélisation de la maladie d'Alzheimer et pour laquelle il y a peu de données sur cette méthode. D'autre part la souche LongEvans, pigmentée, qui présente de bonnes capacités visuelles et de bonnes performances dans différents tests comportementaux présentés à l'aide d'un écran tactile le touchscreen. Nous prévoyons d'utiliser 35 souris et 20 rats. Pour chaque espèce, les animaux seront tout d'abord soumis à une restriction alimentaire permettant d'atteindre 85-90% de leur poids et ainsi d'augmenter leur motivation, ils seront ensuite exposés chaque jour au dispositif, tout d'abord pour les y habituer puis pour leur apprendre les différentes tâches cognitives à réaliser. Une réponse positive sera suivie d'une récompense alimentaire (yahourt sucré aromatisé ou boulettes de nourriture), une réponse négative sera suivie par un flash lumineux au-dessus du dispositif. Les animaux devront apprendre 3 tâches différentes (discrimination visuelle, reconnaissance de place, apprentissage associatif d'objet/ ou de position), qui nécessitent selon la littérature environ 3 semaines d'apprentissage chez la souris et une dizaine de jours chez le rat. Entre chaque tâche d'apprentissage, les animaux seront mis au repos avec une alimentation ad libitum durant deux semaines. De plus, au fil des séances, lorsque les animaux auront compris la tâche, la restriction alimentaire sera diminuée de façon à maintenir les animaux à 90-95% de leur poids.

Les animaux seront maintenus dans des conditions d'hébergement stables et contrôlés (température, hygrométrie) au sein d'une animalerie en cycle inversé lumière/obscurité (lumière 19h à 7h). Les animaux sont maintenus par groupes de 5 souris ou 2 rats dans des cages standards en polycarbonate, avec une litière composée de sciure et enrichie de manière à assurer un bien-être optimal (igloo en carton et matériel pour construire des nids). Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés de la naissance à la mort de l'animal. La mise à mort sera réalisée par du personnel formé et la possibilité de réutiliser les animaux témoins dans d'autres procédures sera considérée. Le bien-être des animaux sera suivi par du personnel formé, bi-quotidiennement pendant la semaine ouvrée 5j/7 et quotidiennement durant les week-end 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.

16095 But du projet: la recherche appliquée et translationnelle

L'encéphalite à anticorps anti-récepteur N-Methyl-D-Aspartate (NMDAR) est une maladie autoimmune 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'autoimmunité se met en place lorsque 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 générale invalidantes et chroniques, comme l'encéphalite à anticorps anti NMDAR ou de manière plus connue la sclérose en plaques, autre exemple de maladie autoimmune touchant le système nerveux central.

Cette maladie a été décrite pour la première fois en 2007. De par sa découverte récente beaucoup de choses restent incompréhensibles. 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 essentiellement la femme jeune (21 ans environ). Elle a été initialement décrite comme se développant en parallèle d'une tumeur de l'ovaire chez la femme mais qu'il existe également une forme due à un ou plusieurs agents infectieux comme par exemple le virus de l'herpès.

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.

De plus, les lymphocytes T, cellules du système immunitaire, sont requis pour le déclenchement et le maintien des maladies autoimmunes à auto anticorps.

Un modèle murin de cette pathologie a été développé au laboratoire. La maladie est induite 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. L'objectif est de caractériser la réponse lymphocytaire T dans le modèle murin de l'encéphalite auto-immune à auto anticorps anti NMDAR dans le but de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques et également pour développer des stratégies d'immunothérapie. La caractérisation des cellules immunitaires se fera à l'aide d'anticorps spécifiques de marqueurs présents sur ces cellules et analysés en cytométrie en flux.

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 :

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 l'étude de la réponse immunitaire, 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.

Le modèle que nous utilisons a été mis en place au laboratoire récemment et certains paramètres de la réponse immunitaire que nous souhaitons étudier n'ont pas fait l'objet de publication dans le monde scientifique. Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux afin de souscrire au principe de réduction, toutefois, 425 animaux seront nécessaires pour mettre en évidence des phénomènes biologiques reproductibles et robustes sur lesquels des analyses statistiques pourront être réalisées.

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), intra-péritonéale, 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 pré-opératoire et en post-opératoire la douleur des animaux ainsi que leur stress. Les animaux sont hébergés dans des cages en environnement standard aux normes européennes. 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 ».

Mots clefs : encéphalite auto-immune ; auto anticorps anti NMDAR ; cellules immunitaires ; cytométrie en flux

16096 Le parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), agent responsable de la toxoplasmose, infecte tous les animaux homéothermes, y compris l'homme et la souris. La souris est un modèle d'étude pertinent car elle est un hôte naturel du parasite. Une caractéristique essentielle de l'infection est que le parasite n'est pas éliminé par le système immunitaire. Il persiste de façon chronique dans les muscles et le cerveau.

Chez l'homme, la toxoplasmose peut se manifester par une inflammation du cerveau chez les sujets immunodéprimés (encéphalite) ou des malformations chez le fœtus en cas de transmission materno-fœtale. En outre, de nombreuses études (causales chez l'animal, plutôt associatives chez l'humain) établissent un lien entre infection latente par *T. gondii* et modifications comportementales, troubles neuropsychiatriques (notamment schizophrénie) et maladies neurodégénératives (notamment maladie d'Alzheimer). Les mécanismes sous-jacents impliquent à la fois une action directe de molécules parasitaires sur les neurones mais aussi des effets indirects, via les facteurs produits par les cellules immunitaires résidentes (par ex. microglie) ou recrutées (par ex. lymphocytes) dans le cerveau. Cependant ces processus sont méconnus.

Ce projet vise à caractériser les mécanismes de formation des lymphocytes T (LT) CD8 mémoires qui se forment dans le cerveau infecté par *T. gondii* et à analyser leur influence sur les altérations du comportement provoquées par le parasite.

Comme détaillé ci-dessous, le projet est conforme aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement:

Remplacement : Au lieu d'être propagé *in vivo* dans des souris, le parasite est cultivé sur des fibroblastes humains. De plus lorsque cela est possible, des expériences *in vitro* utilisant des lignées cellulaires infectées par *T. gondii* sont réalisées. Cependant elles ne permettent pas d'étudier l'impact des LT sur le contrôle du parasite et sur la cognition, et n'interviennent qu'en complément de l'expérimentation animale.

Réduction : Le nombre d'animaux est calculé a priori en respectant les critères pour une analyse statistique appropriée. Les rongeurs utilisés sont consanguins, de mêmes âge et sexe, réduisant la variabilité entre les animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables. Des études sur des modèles animaux similaires ont montré que des lots de 20 animaux par test comportemental étaient nécessaires. Un même lot d'animaux sera utilisé pour plusieurs tests comportementaux consécutifs. Enfin, des méthodes d'analyses multiplexées permettront d'acquérir plus de paramètres par échantillon et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Le bien-être de l'animal est un facteur de variabilité expérimentale. Nous prenons ceci en compte grâce au suivi rapproché quotidien des animaux qui évaluera leur état général (prise de nourriture, toilettage, mouvements), l'aide à l'alimentation en cas de besoin, l'enrichissement de leur environnement et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage). L'expérimentation sera arrêtée en cas de dégradation trop importante de la santé d'un animal selon les points limites d'arrêt de la procédure définis en accord avec le comité local de suivi du bien-être animal (SBEA) pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

Les signes cliniques attendus de la procédure 1 (sévère) sont :

- En phase aiguë (J7-15) : perte de poids et mobilité réduite. Les animaux seront euthanasiés si la perte de poids dépasse 20% du poids initial et la mobilité est fortement réduite pendant >24h. Il sera nécessaire de respecter un délai de 24h car le développement d'une réponse immunitaire permet dans bon nombre de cas une amélioration de l'état général et la transition vers la phase chronique moins symptomatique.

- En phase chronique (>J15) : ataxie / syndrome vestibulaire. Les animaux seront euthanasiés en cas de présence de l'un de ces signes.

Si immédiatement après ou le lendemain d'un gavage ou d'une injection ip ou iv, un animal cesse de s'alimenter et devient prostré, il sera euthanasié.

La procédure ne prévoit pas l'utilisation d'analgésiques ou anti-inflammatoires, car ils risquent d'interférer avec les processus inflammatoires au cours de notre expérimentation.

Le nombre de souris nécessaire pour conduire ce projet est de 1600 souris sur 5 ans.

16097 Les dermatoses inflammatoires comprennent deux maladies principales, le psoriasis et la dermatite atopique, avec une prévalence globale très élevée. Les traitements actuels sont souvent partiellement efficaces car ils ne ciblent qu'une composante de la maladie (système immunitaire ou inflammation épidermique). L'objectif de ce projet est d'ouvrir de nouveaux horizons pour des traitements cutanés innovants, basés sur de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'une d'entre elles vise à enrichir l'arsenal thérapeutique en tirant parti des progrès réalisés dans le domaine des nanotechnologies et proposer ainsi des systèmes innovants d'administration de médicaments cutanés avec une meilleure pénétration de la peau d'agents actifs déjà connus ou nouveaux. Dans ce contexte, des émulsions dites de Pickering suscitent l'intérêt en tant que nouvelles formulations de libération de médicaments. Notre projet se concentre sur la formulation d'une émulsion de Pickering innovante dans laquelle se trouve un immunosuppresseur associé avec un anti-inflammatoire. Notre hypothèse est que l'association de ces deux médicaments en une seule formulation devrait montrer une meilleure efficacité pour le

traitement des maladies cutanées inflammatoires que les médicaments pris un à un, ce qui permettra d'améliorer l'état des patients.

Notre objectif actuel est d'établir la preuve de concept de l'efficacité de ces émulsions de Pickering en tant que nouveau traitement innovant pour les dermatoses inflammatoires, telles que le psoriasis ou la dermatite atopique. Les résultats *in vitro* ont montré que les émulsions sont biologiquement efficaces sur les cellules immunitaires et cutanées, ce qui est un premier échelon pour pouvoir étudier les effets de ces émulsions sur des modèles plus complexes *in vivo*. À ce jour, il n'existe aucune méthode alternative à l'expérimentation animale pour étudier les dermatoses inflammatoires, et dès lors, il est désormais indispensable de poursuivre l'étude sur des modèles animaux spécifiques des maladies avant d'envisager des essais cliniques.

Dans ce projet d'une durée totale de 3 ans seront utilisées des souris dont le nombre a été calculé de manière à être réduit au maximum tout en assurant la pertinence des résultats (864 souris). Afin d'obtenir des résultats statistiquement pertinents, chaque groupe devra être constitué de 12 souris et l'expérience devra être reproduite 3 fois afin de s'affranchir de la variabilité des préparations thérapeutiques. Nous aurons 12 groupes différents (un groupe sans induction de la pathologie, 1 groupe non traité et 10 groupes recevant des combinaisons thérapeutiques différentes). Ce protocole expérimental sera réalisé sur les 2 modèles de pathologies. Le modèle murin de psoriasis sera obtenu par application sur la peau du dos rasée de la souris d'une crème contenant un modulateur du système immunitaire pendant 6 jours consécutifs, temps nécessaire à l'apparition de la maladie. Ensuite, les émulsions de Pickering seront appliquées quotidiennement pendant 9 jours avec évaluation de la pathologie déclenchée. Pour le modèle murin de dermatite atopique, les souris seront sensibilisées pendant 3 semaines par une molécule sensibilisante (ou allergène). Après ces trois semaines, l'application cutanée de ce même allergène sur la peau rasée permettra de déclencher la maladie. Afin d'étudier la modulation de la dermatite atopique, les émulsions de Pickering seront appliquées avant chaque stimulation cutanée par l'allergène, tous les trois jours pendant trois semaines.

Tout au long des procédures expérimentales, nous nous attacherons au bien-être des souris en réalisant un suivi quotidien du développement des pathologies grâce à une fiche de suivi. Des points limites précoces seront mis en place et conduiront à l'arrêt des procédures expérimentales et l'euthanasie de l'animal. Ainsi, le nombre d'animaux (réduction), le bien-être animal (raffinement) et l'inexistence d'une méthode alternative (remplacement) ont été pensés pour respecter au mieux la règle des 3R. L'ensemble des résultats obtenus servira de point de départ pour de futurs essais cliniques chez l'homme.

16098 Les maladies inflammatoires et/ou chroniques, comme les maladies auto-immunes, 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 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 ont été décrits comme participant à la genèse de ces pathologies. Nous savons que les cellules T, qui jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire, sont des acteurs importants de ces dysfonctionnements pathologiques. Nos travaux antérieurs ont permis d'identifier 2 molécules jouant un rôle majeur dans la fonction immunologique des cellules T, et associées à des désordres auto-immuns chez l'homme. Notre compréhension des mécanismes mis en jeu, nous a conduits récemment à mettre en évidence de nouvelles voies de régulation entre ces 2 molécules et d'autres partenaires dans la cellule T. L'objectif de ce projet est d'étudier l'implication de ce réseau de molécules dans des maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaques et la myasthénie, ainsi que les maladies inflammatoires de l'intestin. Pour cela, nous utiliserons des modèles expérimentaux chez la souris pour ces 3 maladies.

Pour répondre à l'objectif du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 2106 animaux sur 5 ans, à raison de 8 ou 16 animaux par groupe expérimental. La règle des 3R sera appliquée selon les principes suivants.

1-Remplacement : Ces maladies sont complexes et mettent en jeu l'activation de cellules pathogènes qui vont migrer à travers l'organisme jusqu'à l'organe cible (cerveau, muscles, intestins) où les dommages inflammatoires apparaîtront. Les méthodes alternatives *in vitro* ne permettent pas actuellement de reproduire l'ensemble de ces mécanismes comme dans un organisme entier. Cependant, l'utilisation des modèles expérimentaux chez la souris, fait suite à plusieurs études dans des modèles cellulaires.

2-Réduction : Pour limiter le nombre de souris nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement significatifs, nous réaliserons un suivi clinique sur des animaux qui fourniront des cellules pour une analyse *in vitro*. En fonction des phases de développement de ces maladies, un point (groupe de 8 souris) ou deux points d'analyse au cours du temps (groupe de 16 souris) seront réalisés. 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.

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 ajouté 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 nidification. 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'angoisse 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 voutée 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.

16099 L'ostéosarcome est la tumeur osseuse cancéreuse la plus courante. La population générale est touchée à raison de 5 cas par million d'habitants. La survie des patients à long terme dépend de: l'emplacement et la taille de la tumeur, la présence de métastases, la réponse à la chimiothérapie ainsi que la qualité de l'ablation tumorale. Ce dernier paramètre est central dans le schéma thérapeutique et les modèles permettant de l'évaluer sont peu nombreux. Afin de déterminer au mieux l'efficacité et les impacts physiologiques de nouvelles molécules anti-cancéreuses nous proposons de réaliser la mise au point un modèle d'ostéosarcome chez la souris reproduisant assez fidèlement la réalité clinique humaine, (génération d'une tumeur osseuse capable de se disséminer jusqu'aux poumons comme lorsqu'un ostéosarcome se développe), et permettant non seulement de tester à termes des traitements innovants, mais surtout de le faire dans le cadre d'une prise en charge globale intégrant l'exérèse chirurgicale de la tumeur initiale de façon à viser une amélioration des techniques de prise en charge de ces cancers. Ce modèle consiste en l'injection de cellules cancéreuses au niveau du tibia des souris qui se développent et forme une tumeur. Afin d'obtenir des résultats exploitables scientifiquement en utilisant le nombre le plus faible d'animaux, 84 souris seront nécessaires au maximum afin de nous assurer de la robustesse du modèle. L'ensemble des expérimentations seront réalisées dans le respect des textes réglementaires relatifs à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Ce projet de 5 ans s'inscrit dans une démarche éthique suivant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ce modèle physiopathologique n'a pas d'équivalent *in vitro*, l'étude statistique envisagée permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la validation du modèle tout en veillant à optimiser les conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux (enrichissement du milieu, visites régulières...) et en tenant compte de la sensibilité des animaux ainsi que des contraintes liées à

l'espèce. Ce projet tient compte des points limites et de la prévention et le traitement des éventuelles douleurs et inconforts qui pourraient apparaître, afin d'assurer des souffrances les plus faibles possibles voire l'inexistence de souffrance et de favoriser le bien-être des animaux tout au long de leur vie. Il pourrait résulter de ces études une amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients, des pistes de développement de nouveaux traitements ainsi qu'une augmentation des connaissances en liens avec leur administration.

16100 Le diabète de type 1 (DT1) constitue un enjeu majeur de santé publique. Son incidence augmente de ~4% chaque année. Il touche surtout les enfants et les jeunes adultes, avec des traitements contraignants à vie et des complications graves sur le long terme. Il s'agit d'une maladie auto-immune. Le système immunitaire s'attaque de façon anormale à l'insuline et à d'autres protéines produites par les cellules bêta pancréatiques (appelées antigènes), menant à leur destruction.

Aujourd'hui on peut seulement remplacer l'insuline par des injections, alors qu'il faudrait intervenir sur le système immunitaire. Il faut donc développer des outils thérapeutiques qui soient capables de neutraliser la réponse auto-immune contre les cellules bêta. Il s'agit là de l'objectif de notre projet de recherche. Grâce à l'expérimentation sur des souris qui développent un DT1, nous souhaitons évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique que nous avons mis au point. Nous privilégions une administration des produits par voie orale, rendant ainsi notre stratégie non-invasive attractive pour une application chez l'Homme.

Le projet examinera :

1) Deux types de traitements utilisant l'insuline et d'autres protéines pancréatiques, sous leur forme naturelle ou 'déguisées' en anticorps, ce qui leur confère la capacité de traverser la barrière intestinale après administration orale.

2) L'administration à deux moments de la vie : néonatale, adulte (avant l'apparition du DT1).

3) Quatre modèles de souris complémentaires : un modèle transgénique, mieux adapté pour étudier les mécanismes thérapeutiques ; deux modèles physiologiques, proches de la maladie humaine ; et un modèle humanisé créé pour ce projet, afin de reproduire l'interaction entre le vaccin et son récepteur humain.

Le succès de la vaccination orale sera déterminé par des mesures de glycosurie et/ou glycémie (glucose dans les urines ou le sang). Les souris traitées seront suivies pendant plusieurs semaines pour analyser l'incidence de la maladie. Les souris non diabétiques seront alors considérées comme protégées du diabète. On détermine ainsi l'efficacité des traitements proposés. Les souris devenant diabétiques seront mises à mort afin d'abrégé leur souffrance.

Au total, nous estimons à 1076 le nombre de souris nécessaires à la complétion de ce projet prévu 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 vaccinales proposées. Dans cet optique de thérapie, l'expérimentation sur animal vigile est essentielle et ne peut être substituée par des approches *in vitro* qui ne reproduisent pas les différents stades de développement du DT1. En revanche, des expériences seront menées *in vitro* pour mieux comprendre les mécanismes biologiques induits par les thérapies utilisées. Une attention particulière sera portée au bien-être animal (propreté de la litière, réserve d'eau dans le biberon, enrichissement, méthodes d'anesthésie générale si nécessaire) et un suivi attentif des souris basé sur des points limites définis, entraînant si nécessaire, la mise à mort anticipée de l'animal.

Si elle est efficace, cette stratégie par voie orale pourra aboutir rapidement à des essais cliniques, pour lesquels nous constituons d'ores et déjà des cohortes de patients adaptées.

16101 Les métastases osseuses, les complications les plus fréquentes du cancer du sein chez les patientes hormono-sensibles sont responsables sur le plan clinique d'une morbidité pour laquelle il n'existe que des traitements palliatifs. La mise en évidence de biomarqueurs pronostiques de survenue de ces métastases permettrait d'adapter le traitement précoce des patientes. Chez ces patientes, des miRNAs sont des biomarqueurs potentiels de la rechute métastatique et nous proposons d'étudier leur rôle dans

la dissémination de ce cancer dans les os, en utilisant un modèle expérimental murin préclinique de cancer du sein hormono-dépendant.

Ce modèle murin récapitule les caractéristiques cliniques de ce cancer. Les cellules tumorales sont injectées au niveau du mamelon de la glande mammaire et migrent lentement dans la moelle des os où elles restent en état de dormance. Nous suivons l'apparition et la survie des cellules tumorales dans la moelle des os par bioluminescence, pendant huit semaines. Les cellules s'adaptent en restant inactives sans former de micro-métastases ce qui est surveillé par radiographie. En fin de protocole, les souris sont mises à mort par dislocation cervicale avec sédation préalable, puis le tissu de la glande mammaire et les pattes des animaux sont prélevés, pour caractériser les cellules tumorales dans ces tissus.

Une étude pilote d'acquisition de compétence, utilisant 10 souris sera faite. L'expérimentation comportera ensuite quatre groupes de dix souris. Dans chacun des groupes, les cellules tumorales ont été modifiées pour étudier l'activité du miRNA dans le processus de dissémination des cellules tumorales. Nous suivrons les animaux pendant huit semaines après l'inoculation des cellules tumorales. Nous utiliserons donc un nombre total de 50 souris.

-L'identification de miRNAs associés à l'apparition de cellules tumorales dans la moelle osseuse, permettra ultérieurement d'envisager l'utilisation de ces miRNAs comme biomarqueurs non invasifs que l'on pourrait doser dans le sang des patientes ayant un cancer du sein. Ceci permettrait d'identifier les patientes susceptibles de développer des métastases osseuses. Ces patientes pourraient alors bénéficier d'un traitement préventif de ces métastases.

Le projet sera conduit selon les règles d'expérimentation des 3R. Afin de réduire le nombre de souris utilisées, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum (10 souris, avec 4 groupes) nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement exploitables (Réduction). Les expériences sont réalisées avec ce modèle murin de dissémination métastatique car c'est le seul modèle proche du carcinome hormono-dépendant, chez les patientes (Remplacement). La surveillance de l'environnement, fournitures et équipement auxquels les souris sont exposées est essentiel à l'entretien des animaux. Les souris cohabitent dans des cages à couvercles filtrant, enrichies. Leur état de bien-être est évalué quotidiennement par l'observation des signes physiologiques (perte de poids, aspects du pelage, morsures...). Lors de l'anesthésie, la température des animaux est maintenue par des coussins chauffants. Lors de l'injection des cellules tumorales, les souris sont anesthésiées sous isoflurane et un gel anesthésiant de lidocaïne est placé sur le mamelon de la glande mammaire. En cas d'observation d'un signe physiologique de douleur, nous administrerons de la rimadyl (carprofène) (2,5-5 mg/kg, à renouveler toutes les 24h si nécessaire) et associée si nécessaire à la buprénorphine (0.05 mg/kg, en sous-cutanée à renouveler toutes les 8 heures, si nécessaire. En cas de stress associé à un point limite en cours d'expérimentation, les animaux sont mis à mort par dislocation cervicale avec sédation préalable. La présente procédure utilise un modèle murin pertinent d'apparition des cellules tumorales disséminées dans la moelle osseuse pour étudier l'activité de miRNAs dans cette dissémination. Ces cellules en restant en dormance dans la moelle ne forment pas de métastases osseuses, mais sont des marqueurs de la dissémination des cancers hormono-dépendant à l'os. C'est également une progression dans le bien-être animal, car cette procédure évite la chirurgie de la glande mammaire avec ouverture et suture et ne nécessite pas de supplémentation sous-cutanée en estrogène. Les cellules tumorales qui s'adaptent dans le canal de la glande ne génèrent pas de tumeur. Dans ce modèle, les cellules tumorales survivent dans la moelle osseuse en état de dormance sans induire de lyse osseuse mesurable (Raffinement).

16102 Le muscle squelettique assure de nombreuses fonctions physiologiques telles que la locomotion, le maintien de la posture, la stabilisation des articulations et la régulation de la production de chaleur. Au cours de la vie d'un individu, le muscle squelettique peut subir diverses atteintes et peut être la cible de diverses pathologies musculaires. À la suite d'un dommage du tissu musculaire, un processus myogénique s'enclenche dépendant de l'activité des cellules souches musculaires (cellules satellites) et permettant la régénération du tissu lésé. Ces cellules s'activent et prolifèrent rapidement générant différents types de cellules myogéniques qui fusionnent pour former les myotubes (fibres immatures)

et finalement des fibres musculaires matures. Le dommage musculaire est également à l'origine d'une réaction inflammatoire d'intensité variable qui participera au processus de régénération.

Dans des myopathies inflammatoires auto-immunes (MIIs), la dérégulation du système immunitaire est associée à un processus de nécrose-régénération du muscle, et à une inflammation importante menant à une perte progressive des fonctions musculaires. Les mécanismes des myopathies inflammatoires sont encore très mal compris, et il n'existe pas de modèles animaux de référence pour les MIIs. Notre projet étudie le rôle d'une cytokine pro-inflammatoire, l'interféron-gamma (IFN γ), que nous avons trouvé fortement exprimé dans les muscles de patients avec MIIs. Notre objectif principal est de déterminer la nature de la toxicité induite par l'IFN γ sur les cellules musculaires.

In vitro, nous avons montré que l'IFN γ inhibe la capacité régénérative des cellules satellites en inhibant leur prolifération et différenciation sans provoquer leur mort, mais en accélérant leur vieillissement. De plus, nous avons également montré que les cellules musculaires stimulées par l'IFN γ expriment anormalement des molécules servant à présenter l'antigène dans le contexte de la réaction immunitaire. Cette observation suggère que l'IFN γ pourrait éventuellement pousser les cellules musculaires à adopter un rôle de cellules présentatrices d'antigène et par conséquent devenir une cible du système immunitaire.

Les effets de l'IFN γ sur la myogenèse et sur le système immunitaire obtenus *in vitro* nécessitent d'être confirmés *in vivo* chez la souris. L'hypothèse que la voie de l'IFN γ puisse constituer une cible thérapeutique potentielle sera testée en bloquant la cascade de signalisation de l'IFN γ dans le but d'améliorer la régénération musculaire, et de réduire les effets négatifs de l'inflammation chronique sur le muscle.

Ce projet devrait aboutir à une meilleure compréhension de la pathogénèse de certaines myopathies inflammatoires et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces études sont d'autant plus importantes que la prévalence de ces maladies musculaires ne cesse d'augmenter et qu'il n'existe actuellement pas de traitement efficace ni curatif pour tous les patients atteints de myopathie inflammatoire.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement de la règle des 3R ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. L'étude de l'exposition directe à une cytokine pro-inflammatoire (IFN γ) sur l'histologie musculaire dans le contexte de régénération musculaire ou non, ne peut s'effectuer que sur les organismes entiers et ne peut donc être substituée par une étude *in vitro*. D'autant plus que des résultats préliminaires ont déjà été obtenus *in vitro* sur des cultures de cellules musculaires humaines, isolées directement de tissu musculaire humain.

Notre étude fera appel à un total de 214 souris réparties sur 4 procédures expérimentales. Afin d'être conforme à la règle des 3R et de réduire le nombre de souris utilisé, nous réaliserons des études préliminaires sur des effectifs réduits et nous avons choisi un nombre de souris minimum permettant des analyses statistiques viables. De plus, nous suivrons les souris dans le temps, et avons sélectionné précisément les périodes de mise à mort pour optimiser nos études sur le processus de régénération musculaire. De plus, la souche de souris C57BL/6J a été sélectionnée pour sa consanguinité réduisant ainsi la variabilité interindividuelle.

Enfin pour le critère de raffinement, nos études reposeront sur la gestion de la douleur et le suivi du bien-être animal. Nous surveillerons quotidiennement les souris et utiliserons des sédatifs et analgésiques au cours des procédures afin de réduire une éventuelle souffrance. Également, nous améliorerons la qualité de l'élevage en enrichissant les cages expérimentales par l'apport de matériel pour construire un nid, et l'hébergement sera assuré en groupe pour permettre aux animaux d'exprimer un comportement social naturel. Enfin, dans le cas où la gestion de la douleur n'est plus efficace la mise à mort de l'animal sera effectuée avant la fin des protocoles expérimentaux.

16103 Notre projet a pour but de comprendre les processus impliqués dans l'apprentissage rapide (ou fast learning). En effet, dans certains contextes, l'apprentissage de réponses comportementales ne fait intervenir que quelques présentations d'un stimulus – comme par exemple un stimulus à éviter –, nécessitant ainsi la formation rapide d'une mémoire de l'épisode mis en jeu et son maintien à long-terme. Ce projet tentera en particulier d'explorer les interactions entre deux structures cérébrales :

d'une part, le striatum, usuellement impliqué dans le contrôle moteur et l'apprentissage d'associations sensorielles/contextuelles et motrices, et d'autre part, certaines aires corticales sensorielles et associatives. Le striatum est souvent considéré comme un filtre, qui extrait les informations pertinentes reçues des aires corticales excitatrices, et dont la sortie inhibitrice contrôle la réalisation de telle ou telle action.

Le projet s'appuie sur trois axes :

- l'étude de l'évolution des changements du dialogue entre le cortex et le striatum (évolution des plasticités cortico-striatales) au cours de l'apprentissage, via des enregistrements électrophysiologiques chez la souris éveillée et a posteriori sur des tranches de cerveau de souris entraînées.
- l'étude électrophysiologique de la balance excitation-inhibition au niveau de cellules uniques et de l'activité du réseau chez la souris éveillée au cours d'une tâche comportementale. La mesure de la balance excitation-inhibition permettra de refléter les changements potentiels de poids des entrées excitatrices (notamment corticales) et inhibitrices (provenant par exemple des interactions entre neurones du striatum).
- l'étude du rôle de la dopamine dans l'apprentissage rapide. La dopamine est un neuro-modulateur modifiant l'activité et l'excitabilité des neurones du striatum et du cortex, qui est notamment impliqué dans les apprentissages par renforcement positif ou négatif.
- le développement de modèles mathématiques rendant compte de ces processus d'apprentissage.

Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux vivants. Les hypothèses des processus impliqués dans l'apprentissage rapide n'ont pas encore été vérifiées chez l'animal éveillé, d'où la nécessité d'avoir recours à des animaux vivants. 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, les souris sont les plus classiquement utilisées, permettant notamment l'accès aux nombreuses lignées transgéniques indispensables pour notre projet. Enfin, il n'est pas possible de remplacer totalement le modèle animal par des modèles *in silico*.

Réduction: l'utilisation de souris transgéniques permet notamment de cibler visuellement les neurones d'intérêt (notamment les neurones impliqués dans les tâches comportementales); 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. En particulier, les propriétés des neurones des souris utilisées pour des enregistrements *in vivo* sont étudiés *in vitro* (après prélèvement du cerveau). De plus, le modèle mathématique permettra d'étudier d'autres aspects des circuits neuronaux, qui nécessiteraient le développement de plusieurs protocoles expérimentaux, et donc l'utilisation de nombreux animaux supplémentaires. 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 minimum 740 et au maximum 1190 animaux (240 animaux par an), car certains protocoles peuvent présenter un taux de succès faible.

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, voire pour certains lots avec un dôme pour se cacher et une roue pour jouer) 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. Les tests comportementaux n'impliquent pas de stimuli aversifs ou douloureux.

16104 L'asthme touche environ 300 millions de personnes dans le monde. C'est une maladie généralement caractérisée par une inflammation chronique des voies aériennes. Elle est caractérisée par la limitation variable du débit d'air expiratoire et des symptômes tels que la respiration sifflante, l'essoufflement, l'oppression thoracique et la toux. Chez les patients asthmatiques, la toux est non seulement un symptôme commun et gênant, qui apparaît souvent dans la phase précédent une crise d'asthme, mais

c'est aussi un facteur prédictif de sévérité et de mauvais pronostic. Le phénomène inflammatoire lors de l'asthme allergique semble jouer un rôle important dans le déclenchement de la toux excessive. Au niveau des voies aériennes, les médiateurs libérés par les cellules inflammatoires peuvent sensibiliser les voies nerveuses impliquées dans le réflexe de toux et ainsi induire une augmentation de la sensibilité de ce réflexe. Ainsi il est important d'identifier les cellules inflammatoires impliquées dans ce phénomène pour envisager de tester les traitements capables d'atténuer ou d'inhiber les facteurs à l'origine de cette toux excessive. Dans cette perspective, nous allons tester des molécules de la pharmacopée humaine et animale qui ont montrés leurs efficacités dans des maladies en lien avec l'inflammation autre que l'asthme. Il s'agira d'un premier test pré-clinique de l'utilisation de ces molécules sur un modèle d'asthme allergique. L'objectif de ce projet est d'étudier plus précisément le rôle de l'inflammation allergique dans le phénomène de déclenchement du réflexe de toux par différents stimuli (chimique et mécanique) à différents stades de développement de la maladie : lors de l'exposition initiale à l'allergène et en situation de phase chronique. Pour ce faire des lapins vont être préalablement sensibilisés puis exposés par voie aérienne à un allergène selon différentes modalités, exposition unique ou exposition chronique, pour déclencher une réaction inflammatoire locale. En chronique, la molécule pharmaceutique aux propriétés anti-inflammatoires retenue lors de l'exposition initiale sera administrée à deux groupes d'animaux selon des cinétiques différentes pour évaluer son potentiel préventif ou curatif sur le développement de l'inflammation allergique chronique de type asthme. Les effets sur les voies respiratoires seront évalués par la mesure de la réactivité bronchique et du réflexe de toux induits sous anesthésie. En conséquence cette étude nécessite pour le premier stade (première exposition) 80 lapins, pour le stade exposition chronique avec traitement préventif (64 lapins) et pour le stade exposition chronique avec traitement curatif (32 lapins). 16 lapins supplémentaires seront nécessaires à la mise au point des techniques de prélèvement et d'analyses post mortem qui seront développées pour ce projet. Un total de 192 lapins sera donc nécessaire, ce travail comprend 2 procédures légères et une procédure sans réveil. Le projet se déroulera sur cinq années. Dans la mesure de la conformité avec les exigences des 3 R, il n'existe pas d'étude antérieure destinée à répondre aux questions scientifiques posées dans ce protocole. Remplacement : L'étude de ce réflexe nécessite l'utilisation d'un modèle physiologique intégré qui ne peut être remplacé par des méthodes alternatives. Le modèle lapin adulte de type Néo-zélandais a été choisi car c'est un modèle animal qui présente un réflexe de toux contrairement au modèle rongeur souris ou rat. Réduction : Les cellules inflammatoires ciblées dans cette étude interviennent précocement dans le processus allergique. C'est la raison pour laquelle la première étape de ce travail va concerner la phase de première exposition. Dans l'éventualité d'une absence de modifications des paramètres étudiés lors de cette première étape, les phases suivantes ne seront pas réalisées (utilisation de 80 lapins dans ce cas). Raffinement : L'hébergement se fait par 8 en box de 30000 cm² au sol nourris ad libitum et l'environnement est enrichi de tunnels. Pendant cette période les animaux font l'objet une surveillance quotidienne. Dans l'éventualité, bien que peu probable, de la survenue de signes de souffrance, de détresse ou d'inconfort réel (diminution ou arrêt de consommation alimentaire ou de boisson sur 48 heures, perte de poids de plus de 10% en 3 jours, prostration, difficulté de déplacement, gênes respiratoires), les mesures mise en place seraient l'arrêt des expériences, isolement, surveillance accentuée. L'animal serait mis à mort en cas de persistance dans les 72 heures ou en cas d'aggravation brutale. Pendant l'expérimentation chez l'animal anesthésié, une surveillance de la profondeur de l'anesthésie et de l'analgésie sera effectuée toutes les 15 minutes.

16105 Le processus fibrosant, c'est-à-dire la formation excessive de tissu conjonctif fibreux en réponse à une atteinte tissulaire souvent inflammatoire, est à l'origine de nombreuses maladies dites 'fibroses'. Elles se traduisent par une rigidité anormale des organes (poumon, foie, rein, cœur, peau...) pouvant avoir à terme, des conséquences létales. Parmi les besoins médicaux que nous avons identifiés, la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF), qui touche environ 17000 personnes en France et 3 millions dans le Monde, est une maladie limitant l'espérance de vie des patients à moins de 2 ans après le diagnostic. Le traitement actuel des stades légers à modérés repose sur deux molécules dont l'efficacité reste insatisfaisante. Ces traitements ralentissent la progression de la cicatrisation des poumons, mais n'atténuent pas toujours les symptômes de la toux et de l'essoufflement.

La stéatose hépatique non alcoolique (NASH) ou maladie "du foie gras ou des sodas" est une inflammation du foie qui évolue vers la fibrose. C'est une maladie en pleine expansion. Elle est trouvée chez 12% des Américains et 6% des Européens, 10 à 20% des adultes en France. Cette fibrose hépatique est l'étape précédant les cirrhoses et accroît fortement le risque de cancer du foie.

Pour ces maladies, il n'existe pas de thérapie spécifique et les patients doivent recourir à des greffes d'organes.

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est une thérapie appliquée dans de nombreux cas de maladies génétiques et de cancers comme la leucémie et le lymphome. La maladie du greffon contre l'hôte est une complication grave de ce type de transplantation dans laquelle le système immunitaire du patient affaibli, permet aux cellules du donneur de produire de nouvelles cellules sanguines. Les lymphocytes T du donneur (greffon) reconnaissent les cellules du receveur comme un non-soi et les attaquent provoquant ainsi une atteinte de différents organes, notamment de la peau (sclérodermie) et des poumons. De 30 à 70% des personnes transplantées développent cette maladie.

Nous avons décidé de nous investir dans la recherche de nouvelles approches thérapeutiques capables de s'opposer au processus fibrosant dans le poumon, le foie et la peau. Nos projets commencent par l'identification de cibles, la validation des mécanismes d'action cellulaires envisagés et la mise en évidence *in vitro* sur des cellules ou des tissus de l'activité de nos composés sur ces mécanismes. Ensuite, lorsque les molécules ont montré une sélectivité et un effet *in vitro* suffisants et que leurs propriétés pharmacocinétiques le permettent, nous devons les tester dans des modèles plus complets récapitulant la complexité de la pathologie en faisant intervenir à la fois les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules immunitaires. Dans ce but, et en nous appuyant sur les données de la littérature, nous souhaitons développer des modèles de fibrose chez la souris.

Dans le cadre de ce projet, plusieurs milliers de molécules seront produites et testées *in vitro* avant d'en sélectionner une dizaine pour l'évaluation *in vivo*. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire, nous utilisons un logiciel de lois statistiques permettant de calculer le nombre minimum de souris indispensable pour montrer que l'effet de nos composés est significatif par rapport aux animaux malades contrôles.

Nous avons aussi mis en place une plateforme d'imagerie permettant de suivre l'évolution de la maladie et l'efficacité de nos composés sans avoir à mettre séquentiellement des animaux à mort.

Le nombre total d'animaux qui pourraient entrer dans ce projet serait de 23540 sur une période de 5 ans. Tous les candidats médicaments ne seront pas testés dans tous les modèles de fibrose ; ainsi ce nombre théorique maximum ne sera pas atteint.

Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé en continu (température, pression, hygrométrie, renouvellement d'air, alternance jour/nuit) relié à un système d'alarme. Ils bénéficieront d'un enrichissement du milieu adapté à l'espèce et à l'étude. La densité dans les cages sera en conformité avec les recommandations et autant que possible, les groupes d'animaux dans les études resteront ceux formés pendant l'acclimatation. Les animaux et leurs conditions d'hébergement (environnement, nourriture, eau de boisson) seront sous surveillance quotidienne.

Certains de nos modèles peuvent apporter de l'inconfort. Nous avons donc établi une liste de points limites au-delà desquels les traitements seraient suspendus ou arrêtés. Pour chaque modèle, un programme d'analgésie sera mis en place.

Enfin, la veille de la littérature nous permet de remplacer certains modèles ou procédures par de nouveaux modèles tout aussi pertinents mais présentant moins d'impact sur le bien-être animal.

16106 Parmi les maladies métaboliques, le diabète de type II est un trouble métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique résultant de défauts dans la sécrétion d'insuline. L'insuline a un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. La résistance à l'insuline et l'obésité sont principalement responsables du diabète de type II. Actuellement aucune stratégie n'existe pour prévenir ou guérir le diabète de type 2. La Fédération de Diabète Internationale a évalué à 463 millions le nombre de patients diabétiques en 2019 (la majorité entre 40 et 59 ans). Cependant, des découvertes récentes laissent à penser que le dysfonctionnement de certaines cellules pancréatiques est au cœur du mécanisme pathogénique du diabète de type II. Nous nous intéressons également aux tissus

adipeux bruns et notamment à son développement. Une meilleure connaissance pourrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques anti-obésité et anti-diabète.

Notre programme de recherche vise à développer de nouvelles molécules actives sur les cellules pancréatiques et les cellules du tissu adipeux selon de nouveaux modes d'action permettant de lutter contre le développement d'une résistance à l'insuline. Après une évaluation *in vitro* de l'efficacité des nouvelles molécules par des techniques de culture de cellules de rongeurs et/ou humaines, les molécules les plus actives seront évaluées *in vivo*. Plusieurs modèles de rongeurs susceptibles de développer une obésité, une résistance à l'insuline, mimant un diabète de type II, ont été documentés dans la littérature.

L'ensemble des animaux qui seront utilisés pour la mise en œuvre de ce projet a été évalué à 17860 sur 5 ans.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire, nous utilisons un logiciel de lois statistiques permettant de calculer le nombre minimum de souris nécessaire pour montrer que l'effet de nos composés est significatif par rapport aux animaux malades contrôles.

Nous avons aussi mis en place une plateforme d'imagerie qui permet de suivre l'évolution de la maladie et de l'efficacité de nos composés sans avoir à mettre séquentiellement des animaux à mort.

Certains de nos modèles peuvent apporter de l'inconfort. Nous avons donc établi une liste de points limites au-delà desquels, les traitements seraient suspendus ou arrêtés. Pour chaque modèle, un programme d'analgésie sera mis en place.

Enfin, la veille de la littérature nous permet de remplacer certains modèles ou procédures par de nouveaux modèles tout aussi pertinents mais présentant moins d'impact sur le bien-être animal.

Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé en continu (température, pression, hygrométrie, renouvellement d'air, alternance jour/nuit) relié à un système d'alarme. Ils bénéficieront d'un enrichissement du milieu adapté à l'espèce et à l'étude. La densité dans les cages sera en conformité avec les recommandations et autant que possible, les groupes d'animaux dans les études resteront ceux formés pendant l'acclimatation. Les animaux et leurs conditions d'hébergement (environnement, nourriture, eau de boisson) seront sous surveillance quotidienne.

16107 Les champs radiofréquences (RF) deviennent de plus en plus ubiquitaires. Au-delà des interrogations soulevées par le public, cela justifie de rechercher s'il existe un risque même faible, de telles expositions à faible niveau, répétées ou continues.

Des résultats récents ont montré que des RF à 900 MHz de faible intensité affectait le profil de température corporelle pendant l'exposition et stimulaient des processus thermorégulateurs de type « réaction au froid » chez des rongeurs. Ces effets peuvent être le résultat de l'impact des RF sur le système de régulation thermique au niveau périphérique (perception par les récepteurs cutanés), sur les effecteurs (tissu adipeux brun ou beige) et/ou au niveau central (l'hypothalamus). En raison de cette physiologie intégrée, les expérimentations projetées pour identifier les tissus et fonctions cibles de l'interaction avec les RF et les voies biologiques activées ne peuvent se faire que *in vivo*. Les premiers résultats suggèrent que la configuration du récepteur TRPM8, le principal récepteur cutané au froid connu chez les mammifères, pourrait être affectée par les RF. Lorsque les récepteurs moléculaires, cellulaires ou tissulaires initiaux seront identifiés, une partie des études paramétriques pourront se faire *in vitro*.

Le premier objectif de cette étude sera donc de rechercher l'effet des RF sur le système de thermorégulation au niveau périphérique (récepteurs cutanés) :

- Si l'impact des RF sur la configuration du récepteur TRPM8 est chronique (cumulatif, indirect), ou aigu.
- Si d'autres récepteurs de la famille des thermorécepteurs TRP sont également sensibles aux RF.

Le deuxième objectif sera d'identifier les effecteurs des périodes d'élévation thermique observées : tissu adipeux brun, tissu beige ou métabolisme hépatique, ainsi que les voies impliquées : UCP1 ou voie de la créatine dans le tissu adipeux, activité mitochondriale au niveau hépatique, avec participation ou non de l'axe hypothalamo-hypophysaire via l'activité thyroïdienne. Lorsque le tissu effecteur sera identifié, une partie des études paramétriques pourra là aussi se faire *in vitro*.

Un troisième objectif vise à mettre en évidence les voies de médiation par l'hypothalamus au niveau central, via le système nerveux sympathique.

Comme il n'est pas connu à ce jour de mécanisme cumulatif sous l'action de champs RF de faible intensité pour expliquer les résultats des études précédentes, un jalon pour consolider cette étude est de rechercher la gamme des paramètres efficaces sur l'activation de la thermorégulation chez la souris (durée des sessions d'exposition, durée quotidienne et intensité du champ RF).

Ce projet sera réalisé sur des souris C57BL/6J. Les animaux, au maximum 490 (478 mâles et 12 femelles), seront exposés aux RF à 900 MHz, durant quelques heures à 7 jours. La fréquence cardiaque, la température corporelle, la température du tissu adipeux brun et l'activité locomotrice des souris seront enregistrées en temps réel par des capteurs télémétriques sur des groupes différents. La consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone seront également mesurées dans des cages métaboliques.

Les souris seront habituellement hébergées à 2 par cage pour leur confort social, sauf en cas de cathéter implanté. Un enrichissement des conditions d'hébergement sera mis en place tout au long de l'étude pour améliorer leur bien-être : litière, objets de découverte et de jeu (bâtonnets de bois, tube cylindrique). Les protocoles expérimentaux limiteront l'inconfort ou l'angoisse des souris utilisées, et réduiront à leur minimum le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants. Les procédures d'anesthésie et d'euthanasie éviteront toute douleur ou angoisse prolongée. Les procédures effectuées sur les animaux pour l'exploration des mécanismes mis en jeu seront : implantation intra-péritonéale de capteurs télémétriques et implantation de cathéter; ces deux modes d'implantations seront précédés d'une sédation anesthésique et d'une administration d'antalgique, et suivis d'une couverture antalgique post-chirurgicale; exposition à un champ radiofréquence de faible intensité; injection intra-péritonéale ou administration orale par gavage d'antagonistes aux récepteurs thermiques et d'agents pharmacologiques; prélèvements de sang. La mise à mort sera effectuée par injection intra-péritonéale d'une dose létale de pentobarbital, après sédation par inhalation d'isoflurane.

16108 La glomérulonéphrite rapidement progressive (GNRP) à croissant est une maladie rénale très rare : 200 à 300 nouveaux cas par an en France. Les causes de GNRP peuvent être diverses, mais impliquent inflammation et auto-immunité délétères. Les traitements actuels sont basés sur une immunosuppression agressive par les corticoïdes et des agents anti-cancéreux ciblant le système immunitaire, aux effets indésirables importants. La qualité de vie des patients est très altérée : 70% des survivants ont une insuffisance rénale terminale, et la mortalité à 5 ans est de 30%.

Nous avons pu montrer sur cellules et dans des modèles murins de GNRP que l'activation de la protéine PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) par la molécule pioglitazone joue un rôle déterminant dans la protection contre la GRNP. La pioglitazone limite la réponse inflammatoire, et protège les podocytes, cellules-clés de la filtration rénale. Pour envisager une étude clinique, il est désormais nécessaire de confirmer l'efficacité de la pioglitazone en tant que traitement de la GNRP chez un autre animal tel que le porc charcutier, dont la physiologie, et notamment la physiologie rénale, se rapproche plus de celle de l'homme.

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 destruction rénale. De plus, l'efficacité, ainsi que les effets indésirables inhérents à toute thérapie, impliquent plusieurs tests préalables chez l'animal avant d'envisager une étude chez l'homme.

Le projet prévoit le recours à 50 porcs au maximum, provenant d'élevages agréés par les autorités compétentes. Ce nombre a été réduit au minimum tout en gardant la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

En se basant sur notre expérience sur d'autres projets, nous affinerons tout d'abord le modèle de GNRP chez le porc par injection de sérum contenant des anticorps dirigés contre les reins (SNT, sérum néphrotoxique). Une douzaine de cochons permettront d'établir un modèle de GNRP robuste, en les répartissant en groupes recevant chacun une dose différente de SNT. Ce modèle expérimental aidera

au développement de nouveaux traitements et à un meilleur dépistage de la maladie chez l'homme en suivant l'évolution de nombreux paramètres biologiques.

Par la suite, 32 animaux, répartis en 2 groupes, recevront quotidiennement en plus du SNT de la pioglitazone ou un placebo, afin de vérifier l'efficacité thérapeutique de cet agoniste de PPAR γ dans un modèle de GNRP porcin. Enfin, un groupe de 6 animaux contrôles recevra uniquement de la pioglitazone ; celui-ci permettra d'évaluer l'effet de la molécule seule sur animal sain.

Pour l'ensemble de ces porcs, le développement de la pathologie sera évalué par mesure de la fonction rénale, grâce à des prises de sang et des collectes d'urines régulières, pendant quatre semaines et une biopsie rénale lors du 14^{ème} jour. L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés permettront de garantir leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long des expériences, afin d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Ce projet représente ainsi une opportunité de fournir une preuve de concept d'une nouvelle classe de thérapie basée sur l'activation de PPAR γ dans le traitement de la GNRP, et d'envisager un repositionnement thérapeutique de la pioglitazone.

16109 Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué, qui provoque 655 000 décès chaque année dans le monde. Les chimiothérapies actuelles ciblent les cellules tumorales en prolifération et restent le traitement de choix des formes avancées de CCR. Cependant, l'efficacité du traitement est fortement entravée par l'apparition fréquente d'une résistance innée des tumeurs aux médicaments et/ou par l'apparition d'une récurrence tumorale post-traitement. Au cours des dernières années, a émergé l'idée qu'une sous-population de cellules tumorales (appelées cellules souches cancéreuses ou CSC) seraient insensibles aux traitements thérapeutiques (chimiothérapies et/ou radiothérapies) et à l'origine des récurrences tumorales dans le CCR. Par conséquent, le ciblage spécifique des CSCs représenterait une approche thérapeutique efficace contre le CCR. Cependant, les événements moléculaires qui régissent l'émergence de ces cellules agressives et résistantes à la chimiothérapie sont encore mal définis. Ainsi, une meilleure compréhension de la biologie des CSCs dans l'initiation et la progression tumorales et dans la résistance au traitement des CRCs est nécessaire pour améliorer le dépistage, la prévention et la prise en charge clinique des patients atteints de cette pathologie.

Ce projet de recherche a pour objectif global de développer de nouvelles perspectives dans la résistance aux médicaments anticancéreux, souvent liés aux propriétés des CSC. Des expériences *in vitro* ont été réalisées sur les cellules humaines cancéreuses transformées traitées par plusieurs molécules de chimiothérapie, qu'il nous faut confirmer *in vivo* chez la souris. Pour cette étude regroupant les différentes parties pré-cliniques du projet (effet des inhibiteurs seuls ou en association ou bien radiothérapie), 432 souris seront nécessaires, soit environ 90 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 (présence de prolapsus, 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.

16110 La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique fréquente des articulations qui entraîne progressivement leur destruction en l'absence de traitement. Elle peut s'associer à des manifestations extra-articulaires dont l'atteinte pulmonaire, proche de la fibrose pulmonaire idiopathique, est la plus fréquente et est responsable d'une surmortalité importante. Souvent méconnue, il n'y a aucune recommandation proposée à ce jour sur sa prise en charge thérapeutique. De grandes quantités d'autotaxine et d'acide lysophosphatidique sont trouvées dans les articulations de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et le ciblage thérapeutique d'autotaxine dans ces conditions réduit l'atteinte articulaire et osseuse destructrice de la polyarthrite rhumatoïde. De plus,

l'autotaxine a été validé en tant que cible thérapeutique dans la fibrose pulmonaire idiopathique par plusieurs essais thérapeutiques chez l'homme.

Afin de limiter le nombre de souris en utilisant un seul groupe de souris contrôles le projet va être de tester l'effet d'un inhibiteur de l'autotaxine, celui d'un inhibiteur de l'acide lysophosphatidique ainsi que d'un anticorps anti-autotaxine sur l'atteinte pulmonaire de la polyarthrite rhumatoïde dans un modèle de souris présentant tout à la fois une maladie articulaire proche de la polyarthrite rhumatoïde humaine associée à une atteinte pulmonaire.

Ce projet étudiant une cible thérapeutique potentielle dans l'atteinte pulmonaire associée à la polyarthrite rhumatoïde nécessite le recours à un modèle animal en raison de la grande complexité physiopathologique de la polyarthrite rhumatoïde humaine avec atteinte pulmonaire faisant intervenir le tissu osseux, le tissu cartilagineux articulaire, l'épithélium pulmonaire et le système immunitaire.

Raffinement : le modèle utilisé est susceptible d'engendrer une douleur, qui sera évitée par application d'un traitement pharmacologique ciblé au cours de l'élevage et par l'application de points limites précoces adaptés au modèle. Les souris cohabiteront à 5 dans un environnement enrichi (maison rouge, coton) renouvelé une fois par semaine.

Remplacement : ces souris sont transgéniques et sont le seul modèle murin connu à ce jour associant arthrite inflammatoire proche de la polyarthrite rhumatoïde humaine et atteinte pulmonaire.

Réduction : le nombre de souris sera limité au nombre minimum indispensable pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un nombre de 120 souris sera nécessaire sur une période de 4 ans.

16111 *Enterococcus faecium* est une bactérie appartenant au genre *Enterococcus* (entérocoques). Comme tous les entérocoques, elle est susceptible d'entraîner des infections, et notamment en milieu hospitalier (infections nosocomiales). Par exemple, aux USA, les entérocoques (surtout *E. faecium* et *faecalis*) sont les seconds pathogènes retrouvés dans les bactériémies (infections du sang) et dans les infections du tractus uro-génital. Les bactériémies à *E. faecium* conduisent en général à des endocardites infectieuses pouvant amener au décès des patients. Au fil des années, les entérocoques ont développé des résistances aux antibiotiques de référence tels que la vancomycine et sont devenus une vraie menace en termes de santé publique. En effet, le nombre d'infections à VRE (Vancomycin Resistant *Enterococcus*) dans les hôpitaux américains a progressé de 9820 cas en 2000 à 21352 en 2006. . Les VRE sont très souvent associés à d'autres résistances, comme par exemple la résistance à la gentamicine, ce qui restreint le choix de l'antibiothérapie. L'une des pistes thérapeutiques envisagée consiste à développer des composés capables de restaurer / potentialiser l'activité de la gentamicine en réduisant sa CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). C'est dans ce contexte que le composé BFP04F10 est actuellement à l'étude. Il a montré, *in vitro*, un effet potentiateur de la gentamicine sur les souches d'*Enterococcus faecium* (diminution considérable des CMI) et pourrait être utile dans le traitement des bactériémies/endocardites à VRE. Toutefois, son activité *in vivo* nécessite d'être investiguée.

L'objectif de cette étude pilote consistera à déterminer la dose létale 100 (DL100) de la souche *E. faecium* d'intérêt dans un modèle d'infection systémique (sepsis) chez l'animal infecté non traité. A la suite de cette étude sera réalisée une étude complémentaire qui permettra d'évaluer l'efficacité de la synergie *in vivo* entre la gentamicine et le composé BFP04F10.

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 8 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 BFP04F10. 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). D'une façon générale pour l'ensemble de l'étude, la prise d'anti-inflammatoires est contre indiquée du fait de l'interaction reconnue avec les modulateurs de l'inflammation, ce qui risquerait même de faire flamber

l'infection. Cependant, si l'animal présente des souffrances extrêmes (convulsions, détresse respiratoire, animal amorphe et non réactif aux stimuli), alors une mise à mort prématurée sera mise en place. De plus, les souris seront surveillées trois fois par jour à partir du jour de l'infection.

56 souris CD1 seront nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

16112 Au cours du développement, les neurones établissent des connexions synaptiques, donnant lieu à un cerveau fonctionnel. Bien que la carte générale des connexions synaptiques est génétiquement préprogrammée, l'activité neuronale per se, qu'elle soit spontanée ou consécutive à une expérience sensorielle, joue un rôle primordial dans le câblage neuronal. Cependant, la question « Comment l'expérience sensorielle guide exactement les connexions des neurones ? » reste largement inconnue. Nous dépendons largement de l'intégration de l'information provenant de nos sens (sensorielle) ou sa représentation cérébrale et de la genèse de mouvements appropriés (moteur). Nous allons donc tester l'hypothèse selon laquelle des signaux extérieurs induisent des patterns spécifiques d'activité neuronale dans le système sensori-moteur, guidant ainsi son développement. En outre, nous chercherons à identifier les perturbations des patterns physiologiques d'activité neuronale associées à des pathologies du système sensorimoteur, comme l'épilepsie et l'hypoxie-ischémie cérébrale aux âges précoces. Pour tester nos hypothèses, nous allons utiliser les systèmes *in vivo* et *ex vivo*, une stratégie qui permettra une vision dynamique de l'activité neuronale au niveau des réseaux neuronaux et dans le contexte comportemental, ainsi qu'au niveau des neurones individuels. Notre approche de base *in vivo* consiste en l'enregistrement d'activité neuronale au sein du système sensorimoteur (au niveau cérébral) et du comportement, spontanée ou en fournissant des stimuli sensoriels, ainsi qu'en modifiant les entrées et les sorties appropriées au long des voies sensori-motrices. Nos expériences seront de nature aigue, d'où, les animaux seront euthanasiés immédiatement après les expériences *in vivo* ou, pour les expériences *ex vivo*, avant le prélèvement de tissu cérébrale. En utilisant cette stratégie nous pourrions montrer si durant les stades précoces de la vie, l'activité neuronale est induite de façon primaire par des signaux externes et sert exclusivement pour le développement cérébral. De plus, notre projet est d'une grande pertinence clinique avec des conséquences directes dans la compréhension et le diagnostic de l'épilepsie et de l'hypoxie-ischémie cérébrale néonatale. Nombre et type d'animaux Nous prévoyons l'utilisation d'environ 2760 rats et 1040 souris (avec l'estimation de la chance de succès à 0.75), âgés de 0 à 60 jours de vie.

Remplacement, réduction, raffinement A notre connaissance, il n'existe actuellement aucune alternative à l'utilisation de systèmes *in vivo* pour étudier des patterns d'activité neuronale par rapport au comportement, dans des états physiologiques et pathologiques, ou à l'utilisation de systèmes *ex vivo* pour une étude complémentaire de mécanismes de base au niveau de neurones individuels. Nous avons estimé le nombre minimal d'animaux nécessaires en utilisant des méthodes statistiques avec 10 animaux choisis par lot en moyenne. Notre plateforme *in vivo* permet d'étudier des multiples paramètres d'activité neuronale et de formes du comportement pour réduire le nombre des animaux. Avant l'intervention expérimentale, les animaux seront hébergés dans des cages enrichies (placement de buchette de bois, dôme-home, nids-végétal ou tunnels dans les cages), et dans un environnement avec température, lumière et hygrométrie contrôlées (cycle 12 heures jour/ 12 heures nuit). Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront maintenus à 37°C (rats) ou 38°C (souris) en utilisant un tapis chauffant. En outre, les animaux seront enveloppés dans un nid de coton précédemment placé dans la cage d'origine (odeurs), mimant ainsi la présence de la mère et/ou des frères/soeurs (contact). Nous allons contrôler non seulement de multiples paramètres comportementaux, mais aussi physiologiques afin de prévenir les signes de douleur. Le comportement (y compris les mouvements des vibrisses, membres antérieurs et postérieurs ou l'activité musculaire) sera enregistré de façon non-invasive, en utilisant des transducteurs piézoélectriques et des caméras vidéo. Concernant les paramètres physiologiques, nous surveillerons la fréquence respiratoire (visuellement ou par transducteurs piézoélectriques) et le rythme cardiaque (utilisation d'électrodes en chlorure d'argent prégélifiées). Nous surveillerons aussi la piloérection (quand applicable), la position/posture de l'animal, la vocalisation, les réponses aux stimuli sensoriels (en particulier, le pincement des orteils) et le niveau d'hydratation (test cutané). Pour toutes les procédures chirurgicales, une combinaison d'anesthésie (générale et locale) et d'analgésie sera

utilisée. Un niveau approprié d'anesthésie sera vérifié par l'absence de myoclonies physiologiques spontanées ou de reflexes/mouvements, une fréquence respiratoire dans des limites connues, l'absence de piloérection (quand applicable), l'absence de vocalisation et l'absence de réaction au pincement de l'orteil. Pendant les enregistrements électrophysiologiques, les animaux seront sous analgésie seule ou sous analgésie et sédation. Dans ces conditions, les animaux peuvent montrer des myoclonies physiologiques et des réflexes. La fréquence respiratoire et le rythme cardiaque doivent être dans la fenêtre des valeurs physiologiques. Les animaux ne devront pas montrer de piloérection (quand applicable) ou de vocalisation. En cas d'un signe de douleur décrit ci-dessus, nous administrerons une dose supplémentaire d'analgésie ou analgésie et sédation.

16113 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 régulent l'équilibre hydro-ionique du système nerveux central. 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 (comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques...). Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de ces pathologies et de pouvoir proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques, il est pertinent d'étudier les interactions entre les astrocytes et le système vasculaire.

Notre projet a donc pour but d'étudier les interactions astrocytes-vaisseaux sanguins et leur rôle dans le couplage neurovasculaire ainsi que dans la régulation de l'homéostasie liquidienne du cerveau. Nous avons choisi de cibler notre étude sur MLC1, une protéine spécifique des astrocytes très enrichie dans les pieds astrocytaires périvasculaires. Le rôle de MLC1 dans le contexte physiologique des régulations astrocytaires périvasculaires n'est pas connu à ce jour.

Pour comprendre le rôle de cette molécule à l'interface gliovasculaire, nous souhaitons étudier son rôle dans le couplage neurovasculaire, en utilisant pour cela l'imagerie Doppler ultrasonore fonctionnelle (fUS), une technique récente, peu invasive et prometteuse pour l'étude de ces phénomènes. Nous nous intéresserons également au rôle de MLC1 dans la régulation des flux liquidiens à l'oeuvre dans le cerveau. Pour cela, nous suivrons par imagerie par résonance magnétique (IRM) le parcours d'un agent de contraste (gadolinium) injecté dans le liquide céphalo-rachidien.

Ce projet repose sur l'utilisation d'un modèle murin dans lequel le gène MLC1 est inactivé, dont le phénotype ne présente pas de caractère dommageable. Grâce à ce modèle, nous souhaitons identifier le rôle de MLC1 dans l'unité gliovasculaire (l'interface entre astrocytes et vaisseaux sanguins). Nos expérimentations seront menées 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 pas de système *in vitro* reproduisant la structure complexe de l'unité gliovasculaire. Cette étude repose sur des techniques d'imagerie fonctionnelles in-vivo peu invasives (IRM et fUS). Ces protocoles sont couramment utilisés au laboratoire et ont été optimisés et raffinés, permettant de réduire à son minimum le nombre d'animaux à utiliser. De plus, nous réduirons au maximum les techniques douloureuses par l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques et en réduisant le temps d'imagerie au nécessaire. Nous veillerons au bien-être des animaux, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation.

Le nombre total d'animaux inclus dans ce projet est de 40 et la durée du projet est de 2 mois.

Ce projet permettra de mieux comprendre le rôle de MLC1 à l'interface gliovasculaire, et plus généralement de comprendre le rôle des astrocytes dans le contrôle des fonctions vasculaires cérébrales qui sont en jeu dans un grand nombre de pathologie cérébrales.

Le nombre total d'animaux à utiliser pour ce projet est de 40 souris.

16114 La technique de télémétrie vise à enregistrer chez l'animal vigile différents paramètres physiologiques tels que des pressions comme la pression artérielle, des bio-potentiels comme l'électrocardiogramme, l'électroencéphalogramme, des températures comme la température corporelle ou l'activité motrice. Le

principe de cette technique consiste à implanter un émetteur radio muni de capteurs de pression ou de bio-potentiel pour enregistrer les paramètres physiologiques précités. De par son principe, cette méthode permet d'enregistrer les paramètres physiologiques en évitant le stress des animaux car ceux-ci sont laissés dans leur environnement familier pendant les mesures. Un autre avantage réside dans le fait que cette technique permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour tester plusieurs candidats médicaments grâce à la durée de vie des batteries des émetteurs radio. Cette technique est applicable pour toutes les espèces : rat, cobaye, lapin, chien et primates non humains (PNH) tels que le macaque cynomolgus et le marmouset. Les études de pharmacologie par télémetrie sont réalisées sur des PNH quand elles ne peuvent pas l'être sur d'autres espèces, du fait de la nature du candidat médicament à tester. C'est le cas par exemple de certaines thérapies géniques qui peuvent déclencher des réactions de rejet chez d'autres espèces plus éloignées de l'Homme. Les dommages escomptés sont relatifs à l'implantation chirurgicale des émetteurs. Le nombre d'animaux utilisés par étude de télémetrie est de 4 à 6 par groupe pour les non rongeurs et 6 à 8 par groupe pour les rongeurs. La grande majorité des études est réalisée sur un groupe, le nombre de groupe pouvant être de 4 au maximum. Compte tenu du nombre d'études réalisées pendant les années précédentes, le nombre d'animaux maximum pour le présent projet (5 ans) est de : 300 pour les rats, 300 pour les cobayes, 250 pour les chiens, 50 pour les lapins, 150 pour les macaques cynomolgus et 50 pour les marmousets. Concernant la règle des 3Rs :

- Actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de reproduire l'intégralité des fonctions et interactions du système cardiovasculaire et d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études.
- Réduction du nombre d'animaux liée à la technique.
- Le nombre d'animaux est également réduit au minimum pour permettre la détection d'effets indésirables. Généralement 4 animaux pour les grosses espèces et 6 animaux pour les rongeurs.
- Les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (hébergement en groupe, jouets, objets à ronger, incitation au fouissement ...).
- Les implantations d'émetteurs sont effectuées par du personnel certifié, sur des animaux en bonne santé et sont encadrées par un vétérinaire.
- Un protocole de soins post opératoire est rigoureusement appliqué. Il comprend un suivi quotidien des animaux afin de contrôler leur état de santé, ainsi que l'administration d'un cocktail de substances analgésiques afin de limiter au maximum toutes douleurs post-opératoires. La durée de ces protocoles de soins est adaptée à chaque animal et suivie par un vétérinaire.

Ce projet est classé avec un degré de sévérité modéré lié aux chirurgies réalisées lors de l'implant des émetteurs de télémetrie. Néanmoins, une fois l'implantation réalisée, plusieurs candidats médicaments pourront être testés dans le cadre de la réduction du nombre d'animaux utilisés dans ce type d'étude.

Les points limites pour ce projet sont :

- Amaigrissement marqué (>20% par rapport au jour de la chirurgie)
- Infection de la zone de l'implant jugée non résorbables par un vétérinaire.
- Signes de douleurs chroniques et non résorbable après un protocole complet de soins postopératoire.

Ces points limites ne concernent que la phase d'implantation des émetteurs. En effet, les études des effets pharmacologiques de candidats médicament sont réalisées à des doses non toxiques et donc non susceptibles d'entraîner la mort ou de signes d'intolérance. Toutefois des effets pharmacologiques réversibles du candidat médicament peuvent provoquer un inconfort des animaux. Suivant les signes cliniques constatés chez l'animal, une décision est prise par le vétérinaire en concertation avec le responsable de projet qui peut-être la mise en place d'un traitement, la diminution de la dose du candidat médicament ou l'arrêt du traitement par le candidat médicament.

Ce type d'étude est requis par les autorités réglementaires, soit dans le cadre de la mise en évidence d'un effet thérapeutique du candidat médicament (études de proof of concept), soit dans le cadre de la pharmacologie de sécurité (recherche des effets indésirables) ou de toxicologie en préalable aux essais cliniques chez l'Homme.

16115 Très récemment, l'épidémie de COVID-19 a rappelé l'importance et les conséquences dramatiques des caillots qui peuvent se former dans les tout petits vaisseaux sanguins (microvaisseaux) irriguant nos organes vitaux. La formation de ces « microthromboses » est en particulier observée dans le cerveau, juste après la survenue d'un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, ce qui empêche les neurones d'être oxygénés et a un impact important sur la mortalité et la récupération des patients. A la suite d'infections très sévères, comme observées dans le sepsis (infection bactérienne grave), un ou plusieurs organes peuvent devenir incapables de fonctionner correctement, suite à l'obstruction de microvaisseaux par des caillots. Pour toutes ces pathologies qui sont associées à un taux important de mortalité et d'invalidation, il est très difficile, voire impossible, de proposer un traitement pour se débarrasser de ces microcaillots chez un patient, sans risquer de déclencher des saignements qui peuvent être tout aussi mortels que les microcaillots eux-mêmes. Récemment, nous avons découvert plusieurs molécules qui pourraient permettre de traiter et/ou prévenir la formation de ces microthromboses, sans déclencher ou majorer la survenue de saignements.

Notre approche innovante est prometteuse, mais nous devons absolument la valider en testant les effets de nos molécules *in vivo*, pour vérifier qu'elles sont efficaces (c'est-à-dire la formation des caillots) et sûres (c'est-à-dire ne provoque pas de saignements) quand on les administre chez des souris. La formation de caillots dans un organisme vivant est tellement complexe et fait intervenir tellement d'acteurs (les cellules des vaisseaux sanguins, des cellules et des protéines circulant dans le sang, etc...) et de paramètres (la taille des vaisseaux sanguins, la vitesse du sang y circulant, etc...) qu'il est impossible de reproduire ces phénomènes dans des tubes à essai. Heureusement, tout est organisé à l'heure actuelle pour que le minimum de tests soit réalisé chez des animaux. Par exemple, la compréhension de la façon dont agissent nos molécules ont été préalablement testées dans des expériences dites *in vitro* en utilisant des protéines ou des cellules humaines.

Nous espérons que, dans le futur, les expériences que nous proposons dans ce projet conduiront au développement des traitements efficaces pour lutter contre les microthromboses dévastatrices.

Afin de répondre à la règle des 3 Rs, les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant 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 seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux. Par ailleurs, pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude, nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure pour avoir une réponse statistiquement analysable. Ainsi le nombre total de souris prévu est de 252.

16116 Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les DC stimulent les réponses des lymphocytes T antigène-spécifique qui sont capables de tuer les cellules cancéreuses. Actuellement, différents sous-groupes de DC ont été identifiés mais, à ce jour, leur rôle n'est pas encore clair. Notre projet vise à révéler la sous-population de DC soutenant la thérapie immunogène anticancéreuse. Dans ce but, nous devons effectuer une induction sélective des sous-groupes de DC par transplantation de moelle osseuse. Le projet actuel ne contient qu'une expérience pilote qui vise à tester la faisabilité technique de la transplantation de moelle osseuse congelée. Ce projet a été conçu dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : cette étude ne peut être réalisée qu'*in vivo*, car il n'existe aucun modèle alternatif pour imiter la réponse de la moelle osseuse et le système immunitaire. De plus, le système immunitaire de la souris est très similaire à celui de l'homme. Réduction : Ce projet, d'une durée de 1 an, impliquera l'utilisation au maximum 60 souris immunocompétentes. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales ne concorderont pas avec notre hypothèse de travail. Raffinement: les animaux seront logés dans le respect de leur bien-être (maximum 5 souris par cage, avec des maisons en coton ou en papier pour améliorer l'environnement). En règle générale, tous les animaux seront acclimatés au moins une semaine avant le début de l'expérience. Au cours de la procédure, les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Des points limites adaptés seront définis pour minimiser le stress et / ou l'angoisse au cours de l'expérience. Toutes les personnes impliquées dans ce projet sont techniquement qualifiées et formées en continu aux pratiques en expérimentation

animale. Une veille scientifique continue sera menée pour exclure toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Afin de tirer le meilleur parti de ces animaux, plusieurs tissus seront collectés pour extraire le maximum de données de chaque expérience et seront partagés avec nos collaborateurs afin de réduire l'utilisation future des animaux

16117 La législation en vigueur en France depuis la parution du décret 2013-118 rend obligatoire la formation à l'expérimentation animale pour toute personne devant manipuler des animaux au cours d'expérimentations. Dans ce cadre, nous allons proposer aux étudiants de Master 2 inscrits dans le Master Santé de notre Université une formation de niveau "Réalisateur" au cours du 1^{er} semestre, leur permettant ainsi de poursuivre leur stage en laboratoire au cours du 2nd semestre dans un cadre réglementaire. Il est envisagé d'avoir une dizaine d'étudiants inscrits par année universitaire. Les travaux pratiques que nous proposerons aux étudiants se feront en 2 séances. La première sera une séance de manipulation des rongeurs avec un apprentissage des gestes de manipulation et de contention avec l'acquisition des pratiques d'administration de substances par injections (sous-cutanée, intra-péritonéale et intra-veineuse de la queue) et par gavage. Les prélèvements sanguins en sublingual (rats) et à la queue (souris) sur animal anesthésié ainsi que le frottis vaginal seront également enseignés au cours de cette première séance. L'ensemble de cette première séance se fera chez le rat et chez la souris. Au cours de la seconde séance les étudiants seront sensibilisés aux bonnes pratiques en matière de bien-être animal dans le cadre de tests comportementaux et d'imagerie par IRM fonctionnelle. Cette séance sera réalisée avec les mêmes souris que celles utilisées pour la première séance en vue de réduire le nombre d'animaux. Les étudiants pourront réaliser différents tests d'anxiété (labyrinthe en croix surélevé, boîte claire/sombre, "open field"), de mesure de l'activité et de la coordination motrice ("open field", rotarod) et un test de mémoire (la reconnaissance d'un nouvel objet). Une souris sera également anesthésiée (isoflurane) pour la partie "imagerie". Aucune injection ne sera pratiquée au cours de cette seconde séance de TP. Pour allier enseignement de qualité et règle des 3R nous envisageons l'utilisation d'un rat et d'une souris par étudiant au cours de la séance 1, c'est-à-dire un total de 10 rats et 10 souris pour la première séance. Les souris de cette première séance seront réutilisées au cours de la séance 2. Donc pour une année universitaire, nous aurons besoin de 10 rats et 10 souris. Sur la durée de cette demande nous aurons besoin de 50 rats et 50 souris. A chaque début d'année, nous entrerons en contact avec la plateforme animalerie pour envisager l'utilisation d'animaux surnuméraires disponibles provenant des laboratoires utilisateurs de la plateforme. Dans le cas contraire, nous commanderons les animaux auprès de fournisseurs agréés. A la fin de ces travaux pratiques et avant euthanasie, nous proposerons aux différents laboratoires ces animaux en vue d'une réutilisation. Les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu (tunnel en carton et litière foisonnante pour les rats, igloo en plastique, roue d'activité et litière foisonnante pour les souris). Le but de cette formation étant d'acquérir les bonnes pratiques en matière d'expérimentation animale chez le rat et la souris, nous ne pouvons pas remplacer ces espèces par d'autres classées inférieures sur l'arbre phylogénétique.

16118 En aquaculture, les pathologies infectieuses constituent une menace importante, d'autant que les traitements ou vaccins existants présentent souvent une efficacité limitée. La vibriose causée par la bactérie *Vibrio Anguillarum* est l'une des principales maladies infectieuses affectant les poissons, crustacés et mollusques de haute valeur économique. Lors d'épisodes aigus, la maladie peut se répandre rapidement, causant une forte mortalité sans que les poissons n'aient présenté de signes cliniques.

Une des stratégies de lutte contre les agents pathogènes est l'exploitation de la variabilité génétique des poissons à résister aux maladies. Elle consiste à sélectionner des individus d'intérêt en se basant sur la valeur génétique familiale de leurs frères et sœurs qui auront préalablement été infectés en conditions contrôlées par le pathogène contre lequel une résistance accrue est recherchée. Le génotypage de ces individus, couplé aux résultats de mortalité et de survie, permettront alors d'estimer le caractère héritable de la résistance au pathogène testé, de tester de nouvelles approches visant à identifier des zones génomiques impliquées dans cette résistance et d'améliorer progressivement la survie moyenne des populations de poissons.

Cette stratégie pour l'amélioration génétique des poissons d'élevage aux agents infectieux est mise en œuvre pour différents couples hôte/pathogène dans le cadre d'une plate-forme associant des partenaires publics et privés. Ce projet consistera à introduire un nouveau couple hôte/pathogène, *Vibrio Anguillarum* chez le bar commun, en développant une épreuve infectieuse expérimentale permettant de reproduire la maladie en conditions contrôlées. Il s'agira ensuite de conduire le protocole établi sur une population de juvéniles issus du noyau de sélection de l'entreprise partenaire afin de déterminer la résistance à la maladie et d'en estimer l'héritabilité.

Trois réalisations de cette épreuve infectieuse expérimentale bar/*Vibrio Anguillarum* sont prévues, représentant un total de 6670 poissons. Ces deux essais permettront d'attester de la faisabilité d'une sélection d'une population de bars sur la résistance à ce pathogène majeur avant d'inclure ce couple hôte/pathogène dans les activités de routine de la plate-forme. La procédure sera réalisée dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'individus testés au minimum requis pour les besoins statistiques et le raffinement des conditions d'hébergement pour assurer des conditions optimales (volume d'eau de mer filtrée et traitée aux UV adapté avec renouvellement en continu, oxygénation suffisante, rythme jour/nuit naturel, présence de suffisamment de congénères pour exprimer un répertoire comportemental riche). Le critère de mortalité utilisé pour identifier les individus d'intérêt et répondre aux objectifs fixés ne permet cependant pas de remplacer les animaux par des méthodes *in-vitro* ni de fixer de points limites.

16119 L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'émergence d'un lymphome B qui est un cancer des lymphocytes B (cellules du système immunitaire localisées dans la moelle osseuse, le sang et les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions lymphatiques). Ces tumeurs sont très hétérogènes rendant leur traitement parfois impossible. Le développement d'un lymphome B est fonction des propriétés intrinsèques de la cellule tumorale (anomalies géniques) mais également des cellules normales environnantes qui participent à la croissance de la tumeur. Considérer l'organisme dans son ensemble est donc indispensable en cancérologie. En ce sens, nous développons des modèles de souris génétiquement modifiées pour étudier *in vivo* les processus de transformation des lymphocytes B pour à terme permettre d'envisager une meilleure thérapeutique de ces cancers.

Au cours du processus de cancérisation, le lymphocyte B subit des modifications d'expression de ces gènes. A l'origine de cela, ce peut être, la dérégulation du facteur de transcription NF-kappaB. Nous développons des modèles de souris présentant une dérégulation de NF-kappaB pour suivre au cours du temps l'émergence de lymphomes B et étudier selon plusieurs approches expérimentales les mécanismes d'induction tumorale. L'anomalie génétique activatrice de NF-kappa B qui nous intéresse dans ce projet est l'amplification du locus REL (2p16.1) qui est associée chez l'homme au lymphome B diffus à grandes cellules de type GCB (germinal center B-cell like) ou GCB-DLBCL. Nous développons différents modèles murins de surexpression du gène REL (murin) uniquement dans les lymphocytes B à différents stades de leur évolution post-médullaire. Nous porterons également une attention particulière au rôle du micro-environnement immunitaire normal sur la croissance tumorale.

Ce projet comprend trois procédures expérimentales. La première consiste en l'élevage des souris d'intérêt analysées ensuite dans les procédures 2 et 3. Cette première procédure aboutira au génotypage des animaux sur un échantillon de tissu prélevé sous anesthésie. Les procédures 2 et 3 consistent à suivre au cours du temps l'émergence d'une tumeur à localisation ganglionnaire et/ou splénique en l'absence ou lors d'une stimulation des lymphocytes B respectivement. Pour limiter le stress et la souffrance des animaux qui développent une tumeur, un suivi journalier est réalisé : analyse du comportement et de l'aspect physique. Un examen plus approfondi est réalisé, chaque 15 jours par palpation et toutes les 3 semaines par prélèvement sanguin sous anesthésie (suivi des cellules tumorales dans le sang) dans le but de monitorer l'apparition d'une tumeur non visible à l'œil. Le point final de la procédure est donné au maximum lorsque la tumeur est visible (sang et/ou apparente) avant l'apparition de signes physiques de souffrance.

Ce projet utilise au total 260 souris.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir :

-remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité du développement tumoral et notamment l'interaction des cellules tumorales avec les cellules saines du système immunitaire, aspect reconnu très important dans les lymphomes. Les modèles murins génétiquement modifiés en fonction des observations faites chez l'homme permettent de mimer la pathogenèse et d'étudier les mécanismes d'induction et d'évolution des tumeurs.

-réduire : les procédures expérimentales sont maîtrisées par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point et la répétition d'expériences.

-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 (anesthésie gazeuse par Isoflurane 3-4%).

16120 Le projet a pour but de développer et caractériser un modèle de cellules de lymphome humain greffé en intrafémoral chez des souris immunodéficientes, les souris NSG (NOD SCID GAMMA) et les souris RAG GammaC γ C γ -/-. Le choix de ces souris immunodéprimées repose sur le fait que ce type de xénogreffe requiert une souche immunodéficiente dépourvue de lymphocytes T et B et de cellules Natural Killer afin de potentialiser la prise de greffe.

Le lymphome non hodgkinien est au 6ème rang des cancers les plus fréquents avec une incidence qui a énormément augmentée ces 2 dernières décennies, sans que les raisons en soient parfaitement connues. Malgré des avancées thérapeutiques notables cette pathologie reste à l'heure actuelle incurable. Les lymphomes sont caractérisés par la prolifération maligne de lymphocytes dans une partie du système lymphatique de l'organisme, comme les ganglions lymphatiques, le sang ou la moelle osseuse.

Ce projet permettra de maîtriser et caractériser un nouveau modèle animal pour mieux comprendre cette pathologie et valider de nouvelles molécules thérapeutiques.

Le respect de la règle des 3R dans ce projet se traduit par :

-le Remplacement: le développement du lymphome est étroitement lié à la présence d'un microenvironnement de soutien (cellules stromales de différents phénotypes, facteurs de croissance...). Ce microenvironnement n'est pas reproductible *in vitro* et c'est pourquoi le recours à des animaux est indispensable pour le développement de ce type de tumeur.

-la Réduction: le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 390 souris, il permettra d'appréhender différents paramètres indispensables. Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Les paramètres ainsi appréhendés seront:

- les cellules tumorales implantées (qualité et nombre): cellules de lymphome B humain (lignée cellulaire DOHH2) en culture ou prélevées chez une souris préalablement greffée avec des cellules tumorales (lignée cellulaire DOHH2)
- le type d'implantation : cellules tumorales seules ou co-implantées avec des cellules stromales humaines
- l'origine des cellules stromales utilisées : tissu adipeux ou organe lymphoïde secondaire (amygdale)

Aux 390 souris nécessaires pour tester ces paramètres, il s'ajoute 30 animaux producteurs. Ainsi le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 420 souris.

-le Raffinement: les animaux sont élevés dans des conditions adaptées: locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture ad libitum, maximum 5 animaux/cage et aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage. L'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques permettra d'éviter toute souffrance aux animaux. De plus, l'évaluation régulière du score de grimace des animaux et le suivi de leur poids et de leur comportement permettra d'avoir un contrôle continu sur leur état de santé.

16121 Le système nerveux et le système immunitaire sont les principales interfaces sensorielles du corps avec l'extérieur, capables de reconnaître, d'intégrer et de répondre à des stimuli variés. Longtemps

considérés comme deux systèmes indépendants, il est de plus en plus évident qu'ils agissent de concert pour détecter les menaces, assurer la défense de l'hôte et maintenir ou rétablir l'homéostasie. Leur intercommunication est donc vitale au bon fonctionnement de notre organisme. Parmi les différents types de neurones, les neurones sensoriels périphériques, dont ceux impliqués dans la sensibilité à la douleurs appelés nocicepteurs, permettent à un organisme de détecter le danger en raison de leur sensibilité aux stimuli mécaniques, thermiques et chimiques. Ils protègent ainsi l'organisme de ce danger en provoquant des douleurs engendrant entre autres des mécanismes d'évitement. En outre, il est de plus en plus évident que les nocicepteurs et le système immunitaire interagissent afin de réguler la douleur, l'inflammation et les défenses de l'hôte. Ainsi, une littérature récente a révélé la forte capacité des nocicepteurs à influencer l'établissement de réponses immunitaires antimicrobiennes et auto-immunitaires via des effets immunosuppresseurs ou pro-inflammatoires. Cependant, la compréhension des mécanismes de régulation du système immunitaire par les nocicepteurs est encore très limitée, et leur influence spécifique sur la réponse immunitaire anti-tumorale inexplorée.

Notre projet de recherche vise à évaluer l'influence des neurones sensoriels (nocicepteurs) sur la croissance tumorale et la réponse immunitaire anti-tumorale associée. Pour répondre à ces questions fondamentales, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées dépourvues de neurones sensoriels : les souris Nav1.8-DTA qui sont totalement dépourvues des neurones exprimant Nav1.8. Cette approche génétique sera couplée à une approche chimique dans laquelle nous traiterons des souris avec un agent chimique détruisant spécifiquement certains types de neurones périphériques : la résinifératoxine (RTX) qui détruit les nocicepteurs exprimant le récepteur TRPV1. Ce projet s'appuiera sur l'utilisation de 4 modèles tumoraux : 1) un modèle murin de métastases pulmonaires induites par l'injection intraveineuse de la lignée de mélanome B16F10 ; 2) un modèle murin de myélome induit par l'injection intraveineuse de la lignée VK*MYC ; 3) un modèle murin de développement spontanée de tumeurs mammaires, le modèle MMTV-PyMT ; 4) un modèle murin d'induction de mélanome, le modèle B-RafV600E. Nous mesurerons la croissance tumorale et étudierons l'activité des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs dans ces souris et les comparerons aux souris contrôles (qui n'ont aucune déficience) pour déterminer la l'influence relative des neurones sensoriels sur la croissance tumorale et la réponse immunitaire anti-tumorale associée. Nous réaliserons également des expériences *in vitro* de mise en culture de cellules immunitaires, de cellules tumorales et de nocicepteurs afin de caractériser finement les mécanismes qui sous-tendent ces interactions neuro-immunologiques (en conformité avec la règle R : remplacement).

Nous estimons que pour répondre convenablement aux réponses scientifiques soulevées, le nombre minimal total de souris nécessaires s'élèverait à 1110 animaux. Pour le modèle de métastases pulmonaires B16, nous comptabiliserons 75 souris Nav1.8-DTA et 75 souris contrôle Nav1.8 (WT) (de même portée) et 150 souris C57Bl/6j (+/- traitées à la RTX). Pour le modèle de myélome VK*MYC, nous comptabiliserons 75 souris Nav1.8-DTA et 75 souris contrôle Nav1.8 (WT) (de même portée) et 150 souris C57Bl/6j (+/- traitées à la RTX). Pour le modèle de développement spontanée de tumeurs mammaires, nous comptabiliserons 75 souris MMTV-PyMT/Nav1.8-DTA et 75 souris contrôle MMTV-PyMT/Nav1.8 (WT) (de même portée) et 150 souris MMTV-PyMT (+/- traitées à la RTX). Pour le modèle d'induction de mélanome BRAF600E, nous comptabiliserons 150 souris BRAF600E (+/- traitées à la RTX). Pour la mise au point des procédures, un total de 60 souris C57Bl/6j seront utilisées. Des lots de cinq souris seront constitués pour chaque condition testée afin de répondre aux exigences des tests statistiques de rang non-paramétrique (Mann Whitney). Les effectifs ont été réduits à leur minimum pour respecter la règle R : réduction et permettre une robustesse statistique.

Pour être en conformité avec les 3R concernant le raffinement, et réduire au maximum la douleur et la souffrance animale, avant toutes procédures ou euthanasie, les souris seront anesthésiées par inhalation de gaz anesthésique vetisoflurane gazeux. Les souris seront hébergées en cage standard avec toit filtrant, avec de la sciure de bois utilisée comme litière, des rouleaux de coton comme matériau de nidification et de maisons de souris achetées dans le commerce et fournies pour l'enrichissement environnemental. Les souris auront un accès à l'eau de boisson et à un régime alimentaire standard ad libitum et seront libres de leur déplacement.

Une surveillance journalière est réalisée dans notre animalerie par des spécialistes animaliers permettant de parer aux besoins nécessaires au bien-être des animaux. Un soin particulier sera apporté pour éviter la souffrance des animaux par la surveillance de signes extérieurs tels que : léthargie, poil hérissé, comportement asocial, dos courbé, animal se déplaçant difficilement, perte de poids supérieure ou égale à 20% de son poids initial et finalement la respiration à plat et tendue. L'atteinte d'un de ces points limites, établi par l'établissement d'une grille de score (voir 3.4.13) entraînera la décision d'euthanasie des animaux concernés. Compte tenu de la nature même du projet qui propose d'explorer l'effet des nocicepteurs (neurones sensoriels impliqués dans la sensibilité à la douleur), aucun analgésique ne peut être utilisé sans compromettre les résultats expérimentaux. De plus, l'effet immuno-modulateur des analgésiques rend leur utilisation impossible dans notre étude.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans la régulation de la tumorigenèse et de la réponse immunitaire anti-tumorale par les fibres sensorielles et la douleur. Ils permettront d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques anti-cancéreuses ciblant les fibres sensorielles et la douleur.

16122 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie chronique, inflammatoire. Cette pathologie entraîne douleurs et handicaps. Les causes sont inconnues ; certains facteurs génétiques, certains facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer une PR) ou l'existence d'autres pathologies, sont autant de terrains favorables pour l'installation de cette maladie. La PR est une maladie qui réduit non seulement la qualité de vie, mais également l'espérance de vie du fait de complications cardiovasculaires. Son coût est élevé pour la société.

Le développement de cette maladie peut se diviser en plusieurs phases : une phase d'initiation pendant laquelle les signes cliniques de la maladie sont invisibles, une phase chronique pendant laquelle le mécanisme inflammatoire s'installe, et une phase aiguë où chaque poussée augmente considérablement la destruction tissulaire.

Les traitements actuels ne peuvent permettre une rémission que d'une minorité de patients, et peuvent améliorer le quotidien chez d'autres, cependant, il ne faut pas mettre de côté les patients chez qui ces traitements ne sont que transitoirement efficaces voire totalement inefficaces. De plus, même si les biothérapies ont fortement amélioré le devenir des patients, elles sont extrêmement coûteuses. L'une des cibles thérapeutiques majeures dans cette maladie inflammatoire est le TNF-alpha (« Tumor Necrosis Factor-alpha ») dont les mécanismes d'action n'ont pas encore été totalement élucidés, ce qui pourrait expliquer certains échecs dans cette stratégie. Pour toutes ces raisons, il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous devons pour cela mieux comprendre les mécanismes d'initiation et de maintien de la maladie tout au long de la vie d'un patient afin d'identifier les meilleures cibles. En particulier, deux protéines, le récepteur de type Toll 9 (TLR9) et la protéine C1q du système du complément pourraient intervenir à différents stades de ces mécanismes et il est nécessaire de mieux définir leurs rôles. Les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans le développement de la PR, or le TLR9 et le C1q sont activés par certains de ces facteurs. De plus, des ligands endogènes libérés au cours de ces deux maladies sont également susceptibles d'activer le TLR9 et le C1q. Nous étudierons en particulier l'implication des polynucléaires neutrophiles (PNN) car ils expriment le TLR9 et des récepteurs pour le C1q. Les PNN sont le plus souvent décrits comme des cellules pro-inflammatoires et sont activés dans la PR ; ils peuvent néanmoins avoir une activité immuno-modulatrice dans certaines conditions et il nous faut donc caractériser plus précisément leur mode d'action dans ces maladies. De plus, les PNN activés produisent des NET (« Neutrophil Extracellular Traps »), des filaments de chromatine extracellulaire potentiellement pro-inflammatoires et pathogènes, et qui sont reconnus par les ACPA (« Anti-Citrullinated Protein Antibodies »), des auto-anticorps pathogènes de la PR. Bien que les ACPA soient spécifiques de la PR, on ne sait pas quels mécanismes et quels antigènes induisent leur production. Nous testerons si les NET sont la cible de différentes populations d'ACPA et surtout s'ils induisent la production d'anticorps anti-NET et d'ACPA, et si cela est contrôlé en partie par le TLR9 et/ou le C1q. Nous évaluerons l'implication de ces protéines et l'efficacité d'une modulation de leur activité sur l'inflammation tissulaire ainsi que les conséquences engendrées sur d'autres mécanismes extra-locaux.

Les mécanismes que nous souhaitons étudier demandent d'avoir un système immunitaire complet et proche de celui de l'homme. L'utilisation de la souris est donc tout indiquée dans cette étude et ne peut être remplacée, mais se fera en accord avec la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés dans les différentes procédures d'immunisation ou d'injection par des NET sera réduit au maximum tout en conservant un nombre suffisant pour permettre des analyses statistiques solides. Des points limites destinés à éviter toute souffrance inutile des souris seront mis en place dans chaque expérience et tous les animaux seront pesés et leur comportement surveillé afin de veiller à leur bien-être. Ce projet de recherche nécessitera l'utilisation de 2790 souris au maximum, sur 5 ans.

16123 L'infarctus du myocarde est un problème de santé public majeur dont la prévalence est estimée à 120 000 cas par an en France. Environ 10% des victimes décèdent dans l'heure qui suit et le taux de mortalité à un an est de 15%. C'est une maladie évolutive qui peut engendrer des arythmies et à terme une insuffisance cardiaque (IC). L'IC chronique (IC) se définit comme l'incapacité de la pompe cardiaque à fournir suffisamment d'oxygène et de nutriments aux organes périphériques. Elle se caractérise par un dysfonctionnement grave des mitochondries, centrales énergétiques des cellules cardiaques et musculaires. L'objectif de notre équipe est de développer une thérapie métabolique de l'IC en utilisant des stimulateurs de la biogenèse et de la fonction mitochondriale. Ces approches sont nécessaires pour compléter les traitements actuels de l'IC et améliorer le métabolisme du cœur défaillant.

La fonction énergétique cellulaire est régulée de manière importante par le fer. Les protéines mitochondriales impliquées dans la production d'énergie et le transport de l'oxygène nécessitent des cofacteurs contenant du fer synthétisés dans les mitochondries (hème, groupements Fer-Souffre). Dans l'IC, il existe une carence en fer systémique avec une prévalence élevée (30 à 50 % des patients) et qui est associée à de moindres capacités à l'exercice et à une mortalité accrue. Pourtant, peu d'études humaines et animales ont exploré la teneur en fer dans les mitochondries d'un cœur défaillant, les seules études ont abouti à des conclusions discordantes ; certaines d'entre elles faisant même état d'une surcharge en fer mitochondrial. Pour optimiser les thérapies métaboliques de l'IC, il est nécessaire de définir précisément l'impact de la carence en fer systémique sur la biogenèse et la fonction oxydative des mitochondries des cardiomyocytes afin de comprendre quand et comment nous devons moduler le métabolisme du fer dans le cœur.

Pour cela, nous avons prévu de générer un modèle d'IC par infarctus du myocarde chez le rat qui présente une carence en fer systémique afin de s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Puis nous caractériserons l'impact de la carence en fer systémique sur l'homéostasie du fer cytosolique et mitochondrial et les fonctions mitochondriales dans les cardiomyocytes défaillants. Afin d'identifier clairement le rôle du fer dans la physiopathologie de l'IC et d'optimiser son contrôle dans l'IC, il est impératif de travailler dans un modèle animal intégrant tous les paramètres de régulation de la fonction cardiaque qui ne peuvent pas être simulés *in vitro*.

Toutes les procédures de ce projet 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) les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux, (iii) l'infarctus du myocarde sera induit en respectant au maximum les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques, (iv) afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés, en fin d'expérimentation les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés. 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 50 rats sera nécessaire pour le projet.

16124 Les récepteurs du GABA (Gamma aminobutyric acid) sont la cible de plusieurs molécules pharmacologiques, incluant les benzodiazépines, les barbituriques. Il a été récemment montré que certaines protéines, des agonistes inverses des récepteurs du GABA, pouvaient avoir un impact sur

l'appétit chez la souris. Malheureusement très peu de choses sont connues dans la régulation de l'expression de ces protéines. Le but de ce projet consiste donc à étudier la régulation et la modulation de l'expression de ces protéines en fonction du régime alimentaire. 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 de permettre ainsi une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Remplacement : cette étude peut être conduite seulement *in vivo* car la modulation du récepteur du GABA implique et/ou affecte des voies métaboliques et/ou des régulations physiopathologiques qui ne peuvent être évalués qu'*in vitro*. Réduction : Ce projet se dessine sur 5 ans et implique l'utilisation (au maximum) de souris immunocompétentes normales et transgéniques (n = 1656). 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 manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux (points limites surveillés, anesthésie des animaux...). Raffinement : 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. 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.

16125 La mucopolysaccharidose type 1 (MPS1) est une maladie rare du stockage lysosomal. Elle entraîne une accumulation de certains composés dans les cellules sous forme de vacuoles.

Dans la forme grave menant à la mort chez l'enfant, les symptômes principaux sont déformations squelettiques, retard moteur et déficit intellectuel. Les patients avec la forme adulte ont une taille presque normale, raideurs articulaires, opacités cornéennes, syndrome du canal carpien et légers changements squelettiques sans déficit intellectuel. Une valvulopathie aortique peut être présente.

Dans le cadre de la recherche de traitements possibles de cette pathologie, un modèle murin (MPS I) est utilisé depuis plusieurs années, possédant une mutation du gène *Idua* (alpha-L-iduronidase) similaire et présentant de nombreux symptômes similaires à l'humain (troubles du squelette, des articulations, de la vision, de la motricité et valvulopathie aortique).

Notre partenaire a mis au point un traitement qui semble à même de contrer les effets délétères de cette pathologie, et serait à même d'améliorer considérablement de tableau clinique des patients.

Pour tester son efficacité, nous prévoyons donc d'étudier ces animaux à l'âge de 6 mois, ce stade présentant déjà des symptômes, et nous les comparerons avec des animaux identiques, mais nourris avec une diète contenant le composé. Un groupe d'animaux contrôles sera aussi employé pour connaître les performances normales d'animaux sains.

Ce protocole nécessite l'utilisation de 44 animaux répartis dans ces trois groupes expérimentaux (8 mâles et 8 femelles pour les deux groupes d'animaux MPS I, et 6 mâles + 6 femelles pour le groupe contrôle, présentant une variabilité moindre).

Une série de protocoles expérimentaux permettra de mettre en évidence les différents troubles observés, mobilité, force musculaire, flexibilité des articulations, valvulopathie cardiaque, troubles de l'audition et de mettre en évidence une amélioration des animaux recevant le traitement.

REPLACEMENT: le traitement a déjà été testé sur des lignées cellulaires afin de montrer sa capacité à réduire l'accumulation de vacuoles dans les cellules, l'un des signes de la pathologie. Nous ne disposons pas d'autre possibilité que le modèle Souris pour valider la capacité de traiter les symptômes actuellement.

RAFFINEMENT: le modèle MPS I est déjà analysé depuis plusieurs années afin de valider son adéquation à l'utiliser pour prévoir l'efficacité de traitements potentiels. Les symptômes observés chez l'animal sont très similaires ce qui renforce cette possibilité. Les différents symptômes sont donc bien

documentés, avec notamment l'apparition d'une mortalité liée à la valvulopathie et aux problèmes de motricité, après 7 mois d'âge. Nous nous plaçons à 6 mois d'âge et la durée du protocole sera inférieure à 3 semaines pour éviter d'avoir des animaux trop âgés. Néanmoins, une surveillance quotidienne des animaux, une pesée ainsi qu'une vérification de l'état des animaux (toilette, posture notamment) de manière hebdomadaire seront pratiqués. Les conditions d'hébergement correspondent aux standards en vigueur, avec nourriture, eau et enrichissement du milieu à disposition. Les animaux seront maintenus en groupe sociaux pour éviter un stress d'isolement. En cas de difficulté de motricité empêchant un accès aisé à l'eau et la nourriture, de la nourriture en gel sera mise à disposition des animaux. Nous utiliserons un tableau de scoring de la douleur afin de déterminer la potentielle exclusion des animaux si une souffrance est présente. Par ailleurs, certains tests (échographie, étude de l'audition) sont effectués sous anesthésie.

REDUCTION: les tests pratiqués peuvent être effectués sur 8 animaux par groupe expérimental, voir 6 lorsque la variabilité est faible au sein d'un groupe. C'est pourquoi nous avons pu réduire le nombre d'animaux à 44 souris au total. Ces effectifs ont été déterminés au vu des résultats préalablement obtenus sur ces tests dans notre structure et au vu de la sévérité des phénotypes attendus.

16126 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules dans le traitement de l'insuffisance rénale aigue.

L'insuffisance rénale aiguë ou IRA est un problème fréquemment rencontré chez les patients hospitalisés (1 à 44%). Son incidence est en augmentation. Cela s'explique par le vieillissement de la population mais également par une plus large utilisation de thérapeutiques à risque d'atteinte rénale (ex: anti-cancéreux). A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement réellement efficace contre l'IRA.

L'IRA est la perte de la fonction rénale, empêchant le maintien de l'équilibre interne de l'organisme (ex: élimination des déchets). Elle survient après une lésion du rein, brutale et massive.

Elle a notamment pour conséquence une diminution du volume d'urine émise, une rétention azotée et une élévation rapide de l'urée et de la créatinine dans le sang.

L'insuffisance rénale peut être induite chez l'animal en provoquant des lésions tissulaires au niveau des reins.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 800 rats et 400 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 le rat ou la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer l'efficacité d'une nouvelle molécule dans le traitement de l'insuffisance rénale aigue. 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 la 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 :

- . le recours à des procédures les moins invasives possibles
- . le suivi des signes cliniques
- . la détermination des points limites
- . un protocole analgésique adapté pour les chirurgies et la période post-opératoire et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adaptés 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
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

16127 Les développements récents de l'immunothérapie basée sur la modification des cellules du patient (CAR-T cells) sont en train de révolutionner la prise en charge et le traitement des cancers du sang. Il s'agit de modifier *ex vivo* les cellules immunitaires du patient pour qu'elles expriment un récepteur synthétique (le CAR) dirigé contre l'antigène CD19, leur permettant alors de reconnaître et de tuer les cellules cancéreuses exprimant cet antigène tumoral à leur surface. Cependant, le coût élevé de ces traitements qui sont patient-spécifiques, la complexité technique de leur mise en œuvre, les effets secondaires observés mais surtout l'efficacité encore limitée dans le temps entraînent un accès restreint à ces nouvelles thérapies.

Notre innovation repose sur un lentivecteur codant pour le CAR CD19 encapsulé dans des polymères chargés positivement et négativement pour former des nanoparticules biodégradables autour du lentivecteur, peu immunogènes, non toxiques et à fort pouvoir de transduction spécifique des lymphocytes T. Cette formulation permet de stabiliser le vecteur lentiviral durant son temps de résidence dans la circulation sanguine et de le protéger des attaques d'anticorps neutralisants générés par le patient et qui impactent l'efficacité de transduction. Grâce à cette technologie de CARs *in vivo*, il n'est donc plus nécessaire de reprogrammer les lymphocytes T *ex vivo*, une simple injection suffit, le patient devenant son propre incubateur de cellules T. Les étapes lourdes et complexes de sélection des lymphocytes du patient, leur activation et leur amplification deviennent inutiles ce qui réduit drastiquement le coût du traitement, généralise sa mise en œuvre dans les centres de soins et finalement le rend accessible à tous les patients. Ce protocole d'administration par simple injection intraveineuse permet également plusieurs cycles de traitement (ce qui n'est pas le cas avec la technologie actuelle) et donc potentiellement une meilleure efficacité sur le long terme.

Dans nos modèles cellulaires nous avons mis au point les conditions de formulation de notre produit permettant de transduire de manière robuste et reproductible (45 % de cellules modifiées) les cellules immunitaires murines et humaines avec différents transgènes (GFP, luciférase, mCherry, CAR-CD19). Nous avons également démontré qu'il était possible de modifier spécifiquement ces cellules pour qu'elles expriment en surface le CAR anti-CD19. Nous avons pu démontrer dans des tests de cytotoxicité que les lymphocytes modifiés avec ce CAR-CD19 sont capables d'éliminer des cellules cancéreuses exprimant l'antigène tumoral CD19 tout en restant inactives sur des cellules CD19-négatives.

Chez la souris nous avons déjà prouvé que l'administration répétée (jusqu'à 5 injections) par voie intraveineuse (bolus et perfusions) de lentivecteurs (où le CAR CD19 est remplacé par un gène rapporteur GFP) encapsulés dans les polymères produits dans notre laboratoire est parfaitement tolérée et que ces nanoparticules permettent effectivement de transduire de manière dose-dépendante les différents types de cellules mononuclées sanguines.

Le projet d'expérimentation animale présenté ici constitue la première étape du développement préclinique de notre CAR *in vivo* ciblant le marqueur tumoral CD19 que nous souhaitons mener jusqu'à la démonstration de sa sécurité et de son efficacité thérapeutique dans des modèles murins de cancers hématologiques. Ces résultats sont un prérequis avant de lancer un essai clinique de phase I/II en 2022. Mais avant d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de notre produit dans des modèles murins de cancers hématologique, nous devons démontrer chez l'animal que la modification des cellules sanguines est bien spécifique des lymphocytes T ciblés lorsque notre produit est injecté et distribué entre les différents compartiments de l'organisme et que notre CAR *in vivo* est bien toléré lors d'administrations répétées à des doses croissantes. Ces problématiques ne peuvent être abordées que via l'expérimentation animale. Aussi nous explorerons la biodistribution et la sécurité de notre produit sur des souris NSG (NOD Scid Gamma) immunodéficientes mais greffées avec des cellules mononuclées de sang périphérique humaines (PBMCs en anglais) afin de mimer le plus possible les conditions physiopathologiques humaines. Le choix de la souris NSG est justifié car c'est un modèle de référence en oncologie très largement caractérisé et dont la prédictibilité a été démontrée dans de nombreuses études en immunothérapie.

Ainsi, nous nous proposons d'injecter les lentivecteurs (exprimant la GFP ou CAR CD19) encapsulés dans les polymères produits dans notre laboratoire à des doses croissantes et de suivre leur devenir au niveau cellulaire chez la souris par cytométrie en flux. Un marquage spécifique du transgène délivré par le lentivecteur permet de suivre notre produit au cours du temps dans les différents types cellulaires

sanguins, ce qui réduit de manière importante le nombre d'animaux puisque le produit sera suivi sur 24 jours pour une même souris. A l'issue de l'étude, les animaux seront euthanasiés et les principaux organes seront collectés pour analyser quantitativement la répartition du produit par une deuxième méthode complémentaire de la cytométrie en flux (qPCR).

Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude approfondie permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Cette étude nécessite 234 animaux au total. Afin de minimiser la consommation inutile des 234 souris qui pourraient être exposées à des doses dépassant la dose maximale tolérée, nous avons prévu 5 procédures qui seront lancées de manière séquentielle après avoir vérifié que les doses et protocoles d'injections de la procédure précédente ne présentent pas de toxicité macroscopique particulière.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitement anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations par voie intraveineuse ou perfusion se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués. L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien.

16128 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 provoquant ainsi une gêne à l'expulsion du sang vers l'aorte. Le seul traitement qui permet actuellement d'éviter une évolution fatale consiste à remplacer la valve aortique par une valve artificielle. Comprendre les mécanismes d'évolution de la maladie est un enjeu majeur pour envisager à l'avenir un traitement médical qui serait une alternative au remplacement valvulaire. Il est connu que les patients ayant eu une radiothérapie du thorax sont plus à risque de développer un RA et il a été décrit que ces patients avaient une maladie qui évolue plus rapidement. Nous pensons que cela pourrait être dû à des lésions des artères coronaires par la radiothérapie. Ce projet propose l'ensemble des procédures permettant d'induire des calcifications de la valve aortique par radiothérapie, et de mesurer la perfusion cardiaque en imagerie pour caractériser les effets de la radiothérapie sur la perfusion myocardique.

Dans ce cadre, le remplacement de l'utilisation des animaux est impossible. Afin de sensibiliser l'activation des mécanismes de calcification, nous utiliserons une souche de souris transgénique ApoE^{-/-} qui présente une athérosclérose précoce, sans nécessité de régime particulier. Nous comparerons ces souris ApoE^{-/-} à un groupe témoin.

L'ensemble du projet inclura 30 animaux: 10 animaux formeront un groupe irradié (RT+), 10 animaux formeront un groupe non irradié (RT-), et 10 animaux formeront un groupe témoin (Ctrl). Les animaux seront suivis par des examens non invasifs: (i) échographie pour évaluer les conséquences de l'irradiation sur le myocarde et l'aorte, (ii) IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) pour évaluer le fonctionnement cardiaque et (iii) TEP (Tomographie par Emission de Positons) pour mesurer la perfusion myocardique au repos et en situation de stress par un médicament qui dilate les coronaires (regadenoson). L'imagerie TEP/IRM présente l'avantage de faire ces deux examens en même temps et donc de réduire la durée d'anesthésie de l'animal. Enfin, à la fin du projet, les animaux seront mis à mort. Nous préleverons le cœur des souris afin de pouvoir récupérer les microsphères et quantifier la perfusion myocardique.

Pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à cette étude nous réaliserons séquentiellement les examens d'imagerie chez les mêmes animaux (échographie et TEP/IRM), et nous avons mis en place une stratégie d'optimisation des prélèvements pour analyse au moment de la mise à mort des animaux. Afin de remplacer autant que possible l'expérimentation animale, nous remplaçons certaines expériences par des études *in vitro* (cultures cellulaires). Cependant, l'utilisation d'animaux est rendue nécessaire ici car il n'existe pas de modèle *in vitro* de rétrécissement aortique.

Concernant le raffinement des conditions expérimentales, les animaux seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes (type IV) avec une pression de 20-25Pa avec un

renouvellement de 25 fois le volume d'air de la pièce toutes les heures et une température de $21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. L'exposition à la lumière sera de 6h45 à 18h45. 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. Cette litière est plus chère mais possède les avantages d'être peu poussiéreuse, moins allergisante que le résineux. Les animaux sont hébergés par groupe de 5 afin de conserver les interactions sociales. La litière est enrichie avec de la litière cellulose Alpha Dry permettant la confection de nid. A la suite des procédures, un suivi quotidien est effectué par du personnel formé et expérimenté. Des éventuels signes de souffrance seront surveillés étroitement après irradiation. L'apparition d'une 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) pendant 1 semaine après l'irradiation.

16129 Les développements récents de l'immunothérapie basée sur la modification des cellules du patient (CAR-T cells) sont en train de révolutionner la prise en charge et le traitement des cancers du sang. Il s'agit de modifier *ex vivo* les cellules immunitaires du patient pour qu'elles expriment un récepteur synthétique (le CAR) dirigé contre l'antigène CD19, leur permettant alors de reconnaître et de tuer les cellules cancéreuses exprimant cet antigène tumoral à leur surface. Cependant, le coût élevé de ces traitements qui sont patient-spécifiques, la complexité technique de leur mise en œuvre, les effets secondaires observés mais surtout l'efficacité encore limitée dans le temps entraînent un accès restreint à ces nouvelles thérapies.

Notre innovation repose sur un lentivecteur codant pour le CAR CD19 encapsulé dans des polymères chargés positivement et négativement pour former des nanoparticules biodégradables autour du lentivecteur, peu immunogènes, non toxiques et à fort pouvoir de transduction spécifique des lymphocytes T. Cette formulation permet de stabiliser le vecteur lentiviral durant son temps de résidence dans la circulation sanguine et de le protéger des attaques d'anticorps neutralisants générés par le patient et qui impactent l'efficacité de transduction. Grâce à cette technologie de CARs *in vivo*, il n'est donc plus nécessaire de reprogrammer les lymphocytes T *ex vivo*, une simple injection suffit, le patient devenant son propre incubateur de cellules T. Les étapes lourdes et complexes de sélection des lymphocytes du patient, leur activation et leur amplification deviennent inutiles ce qui réduit drastiquement le coût du traitement, généralise sa mise en œuvre dans les centres de soins et finalement le rend accessible à tous les patients. Ce protocole d'administration par simple injection intraveineuse permet également plusieurs cycles de traitement (ce qui n'est pas le cas avec la technologie actuelle) et donc potentiellement une meilleure efficacité sur le long terme.

Dans nos modèles cellulaires nous avons mis au point les conditions de formulation de notre produit permettant de transduire de manière robuste et reproductible (45 % de cellules modifiées) les cellules immunitaires murines et humaines avec différents transgènes (GFP, luciférase, mCherry, CAR-CD19). Nous avons également démontré qu'il était possible de modifier spécifiquement ces cellules pour qu'elles expriment en surface le CAR anti-CD19. Nous avons pu démontrer dans des tests de cytotoxicité que les lymphocytes modifiés avec ce CAR-CD19 sont capables d'éliminer des cellules cancéreuses exprimant l'antigène tumoral CD19 tout en restant inactives sur des cellules CD19-négatives.

Chez la souris nous avons déjà prouvé que l'administration répétée (jusqu'à 5 injections) par voie intraveineuse (bolus et perfusions) de lentivecteurs (où le CAR CD19 est remplacé par un gène rapporteur GFP) encapsulés dans les polymères produits dans notre laboratoire est parfaitement tolérée et que ces nanoparticules permettent effectivement de transduire de manière dose-dépendante les différents types de cellules mononuclées sanguines.

Le projet d'expérimentation animale présenté ici constitue la première étape du développement préclinique de notre CAR *in vivo* ciblant le marqueur tumoral CD19 que nous souhaitons mener jusqu'à la démonstration de sa sécurité et de son efficacité thérapeutique dans des modèles murins de cancers hématologiques. Ces résultats sont un prérequis avant de lancer un essai clinique de phase I/II en 2022. Mais avant d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de notre produit dans des modèles murins de cancers hématologique, nous devons démontrer chez l'animal que la modification des cellules sanguines est bien spécifique des lymphocytes T ciblés lorsque notre produit est injecté et distribué

entre les différents compartiments de l'organisme et que notre CAR *in vivo* est bien toléré lors d'administrations répétées à des doses croissantes. Ces problématiques ne peuvent être abordées que via l'expérimentation animale. Aussi nous explorerons la biodistribution et la sécurité de notre produit sur des souris NSG (NOD Scid Gamma) immunodéficientes mais greffées avec des cellules souches hématopoïétiques CD34-positives afin de mimer le plus possible les conditions physiopathologiques humaines. Le choix de la souris NSG-hCD34+ est justifié car c'est un modèle de référence en oncologie très largement caractérisé et dont la prédictibilité a été démontrée dans de nombreuses études en immunothérapie.

Ainsi, nous nous proposons d'injecter les lentivecteurs (exprimant la GFP ou CAR CD19) encapsulés dans les polymères produits dans notre laboratoire à des doses croissantes et de suivre leur devenir au niveau cellulaire chez la souris par cytométrie en flux. Un marquage spécifique du transgène délivré par le lentivecteur permet de suivre notre produit au cours du temps dans les différents types cellulaires sanguins, ce qui réduit de manière importante le nombre d'animaux puisque le produit sera suivi sur 24 jours pour une même souris. A l'issue de l'étude, les animaux seront euthanasiés et les principaux organes seront collectés pour analyser quantitativement la répartition du produit par une deuxième méthode complémentaire de la cytométrie en flux (qPCR).

De plus, nous allons injecter les polymères et agents de ciblage des lymphocytes T préalablement couplés à des sondes fluorescentes à des doses uniques et suivre leur devenir chez la souris par imagerie en fonction du temps. A l'issue de l'étude, les animaux seront euthanasiés et les principaux organes seront collectés pour analyser quantitativement la répartition de ces molécules par des méthodes complémentaires de l'imagerie (qPCR ou HPLC).

Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude approfondie permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Cette étude nécessite 252 animaux au total. Afin de minimiser la consommation inutile des 252 souris qui pourraient être exposées à des doses dépassant la dose maximale tolérée, nous avons prévu 7 procédures qui seront lancées de manière séquentielle après avoir vérifié que les doses et protocoles d'injections de la procédure précédente ne présentent pas de toxicité macroscopique particulière.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitement anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations par voie intraveineuse ou perfusion se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués. L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien.

16130 Les développements récents de l'immunothérapie basée sur la modification des cellules du patient (CAR-T cells) sont en train de révolutionner la prise en charge et le traitement des cancers du sang. Il s'agit de modifier *ex vivo* les cellules immunitaires du patient pour qu'elles expriment un récepteur synthétique (le CAR) dirigé contre l'antigène CD19, leur permettant alors de reconnaître et de tuer les cellules cancéreuses exprimant cet antigène tumoral à leur surface. Cependant, le coût élevé de ces traitements qui sont patient-spécifiques, la complexité technique de leur mise en œuvre, les effets secondaires observés mais surtout l'efficacité encore limitée dans le temps entraînent un accès restreint à ces nouvelles thérapies.

Notre innovation repose sur un lentivecteur codant pour le CAR CD19 encapsulé dans des polymères chargés positivement et négativement pour former des nanoparticules biodégradables autour du lentivecteur, peu immunogènes, non toxiques et à fort pouvoir de transduction spécifique des lymphocytes T. Cette formulation permet de stabiliser le vecteur lentiviral durant son temps de résidence dans la circulation sanguine et de le protéger des attaques d'anticorps neutralisants générés par le patient et qui impactent l'efficacité de transduction. Grâce à cette technologie de CARs *in vivo*, il n'est donc plus nécessaire de reprogrammer les lymphocytes T *ex vivo*, une simple injection suffit, le patient devenant son propre incubateur de cellules T. Les étapes lourdes et complexes de sélection des lymphocytes du patient, leur activation et leur amplification deviennent inutiles ce qui réduit drastiquement le coût du traitement, généralise sa mise en œuvre dans les centres de soins et finalement le rend accessible à tous les patients. Ce protocole d'administration par simple injection

intraveineuse permet également plusieurs cycles de traitement (ce qui n'est pas le cas avec la technologie actuelle) et donc potentiellement une meilleure efficacité sur le long terme.

Dans nos modèles cellulaires nous avons mis au point les conditions de formulation de notre produit permettant de transduire de manière robuste et reproductible (45 % de cellules modifiées) les cellules immunitaires murines et humaines avec différents transgènes (GFP, luciférase, mCherry, CAR-CD19). Nous avons également démontré qu'il était possible de modifier spécifiquement ces cellules pour qu'elles expriment en surface le CAR anti-CD19. Nous avons pu démontrer dans des tests de cytotoxicité que les lymphocytes modifiés avec ce CAR-CD19 sont capables d'éliminer des cellules cancéreuses exprimant l'antigène tumoral CD19 tout en restant inactives sur des cellules CD19-négatives.

Chez la souris nous avons déjà prouvé que l'administration répétée (jusqu'à 5 injections) par voie intraveineuse (bolus et perfusions) de lentivecteurs (où le CAR CD19 est remplacé par un gène rapporteur GFP) encapsulés dans les polymères produits dans notre laboratoire est parfaitement tolérée et que ces nanoparticules permettent effectivement de transduire de manière dose-dépendante les différents types de cellules mononuclées sanguines.

Le projet d'expérimentation animale présenté ici constitue la première étape du développement préclinique de notre CAR *in vivo* ciblant le marqueur tumoral CD19 que nous souhaitons mener jusqu'à la démonstration de sa sécurité et de son efficacité thérapeutique dans des modèles murins de cancers hématologiques. Ces résultats sont un prérequis avant de lancer un essai clinique de phase I/II en 2022. Mais avant d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de notre produit dans des modèles murins de cancers hématologique, nous devons démontrer chez l'animal que la modification des cellules sanguines est bien spécifique des lymphocytes T ciblés lorsque notre produit est injecté et distribué entre les différents compartiments de l'organisme et que notre CAR *in vivo* est bien toléré lors d'administrations répétées à des doses croissantes. En plus du devenir des nanoparticules, nous souhaitons également évaluer la biodistribution de chaque constituant de nos nanoparticules (polymères et agents de ciblage). Ces problématiques ne peuvent être abordées que via l'expérimentation animale. Aussi nous explorerons la biodistribution et la sécurité de notre produit sur des souris immunocompétentes afin de mimer le plus possible les conditions physiopathologiques humaines. Le choix de la souris est justifié car c'est un modèle de référence en oncologie, avec des souches dont le système immunitaire a été très largement caractérisé et dont la prédictibilité a été démontrée dans de nombreuses études en immunothérapie.

Ainsi, nous nous proposons d'injecter les lentivecteurs (exprimant la GFP ou CAR CD19) encapsulés dans les polymères produits dans notre laboratoire à des doses croissantes et de suivre leur devenir au niveau cellulaire chez la souris par cytométrie en flux. Un marquage spécifique du transgène délivré par le lentivecteur permet de suivre notre produit au cours du temps dans les différents types cellulaires sanguins, ce qui réduit de manière importante le nombre d'animaux puisque le produit sera suivi sur 24 jours pour une même souris. A l'issue de l'étude, les animaux seront euthanasiés et les principaux organes seront collectés pour analyser quantitativement la répartition du produit par une deuxième méthode complémentaire de la cytométrie en flux (qPCR).

De plus, nous allons injecter les polymères et agents de ciblage des lymphocytes T préalablement couplés à des sondes fluorescentes à des doses croissantes et de suivre leur devenir chez la souris par imagerie en fonction du temps. A l'issue de l'étude, les animaux seront euthanasiés et les principaux organes seront collectés pour analyser quantitativement la répartition de ces molécules par des méthodes complémentaires de l'imagerie (qPCR ou HPLC).

Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude approfondie permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Cette étude nécessite 346 animaux au total. Afin de minimiser la consommation inutile des 346 souris qui pourraient être exposées à des doses dépassant la dose maximale tolérée, nous avons prévu 10 procédures qui seront lancées de manière séquentielle après avoir vérifié que les doses et protocoles d'injections de la procédure précédente ne présentent pas de toxicité macroscopique particulière.

De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire

et de traitement anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations par voie intraveineuse ou perfusion se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués. L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien

16131 Les résultats obtenus devraient contribuer à mieux comprendre le décours de l'infection virale du SARS-CoV2 et les atteintes histopathologiques observées en clinique humaine.

Le SARS-CoV2 pour « severe acute respiratory syndrome » qui se traduit par syndrome respiratoire aigu sévère -coronavirus 2 a émergé en Chine dans la province de Hubei en fin d'année 2019. Il s'est propagé au monde entier et est responsable de la COVID19, maladie qualifiée de pandémie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Une caractéristique des SARS est d'infecter tout particulièrement les voies respiratoires en particulier les poumons ; par ailleurs, il a été montré que le SARS-CoV (ou SARS-CoV1 à l'origine de l'épidémie 2003) est capable d'infecter d'autres tissus tel que le tissu nerveux. Les conséquences de l'infection de ces autres tissus sont actuellement peu connues et sont difficiles voire impossible à étudier chez l'Homme. Seuls les modèles animaux peuvent permettre d'aborder précisément ce point. Une difficulté rencontrée dans le cadre de SARS-CoV2 est que les modèles animaux ne sont pas sensibles et ne développent pas de pathologie suite à leur exposition à ce virus (comme pour le SARS-CoV de 2003). En effet, l'être humain est sensible au SARS-CoV2 (ou SARS-CoV), car ce dernier après son entrée dans le corps humain se fixe à un récepteur constituant la « porte d'entrée » du virus dans les cellules, il s'agit du récepteur ACE2 (enzyme de conversion de l'angiotensine 2). Il a donc été généré des souris transgéniques porteuses de la protéine humaine ACE2 dont l'expression est régulée par un promoteur humain le cytokératine K18. Ces souris expriment le récepteur ACE2 « humain » (lignées de souris transgénique K18-hACE2). Elles devraient donc développer la pathologie relative au SARS-CoV2, la COVID19, comme cela a été le cas pour les expériences qui ont été conduites sur le SARS-CoV après l'épidémie de 2003. Sur ce modèle, nous allons étudier la charge virale des souris qui auront été infectées, la présence du virus ou de marqueurs viraux ou de marqueurs de l'inflammation dans différents tissus, et par des études histologiques nous évaluerons précisément les atteintes anatomopathologiques de différents tissus tel que le système nerveux central. Une partie de ces animaux seront utilisées pour évaluer leur fonction respiratoire avant et après infection, par une technique non invasive sur animal éveillé. Enfin, nous ferons également un test vaccinal sur un groupe de souris.

Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes *in vitro* ...) est préféré. Toutefois, vu la nature de nos recherches, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire, et actuellement il n'existe que des souris transgéniques rendues sensibles au SARS-CoV2 contrairement aux souris sauvages qui ne sont pas sensibles à ce virus. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le design de nos expériences a été calculé au plus juste, en tenant compte de la puissance des analyses statistiques. Nous utiliserons 55 souris mâles et 45 souris femelles adultes pour cette étude. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale sera mise en œuvre 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.

16132 Le syndrome IPEX ou syndrome d'immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X est une pathologie immune primitive se manifestant par des atteintes auto-immunes sévères chez les garçons, souvent fatale dans la petite enfance. Cette pathologie est la conséquence de mutations dans le gène FOXP3, aboutissant à une perte de fonction des lymphocytes T régulateurs (Treg), qui représentent une petite proportion des globules blancs assurant le contrôle de la réponse immunitaire au soi. Le traitement actuel inclut une immunosuppression, une thérapie hormonale et la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Ces traitements ne sont que partiellement efficaces et sont limités par la survenue de complications infectieuses et de toxicité. Ainsi, une alternative thérapeutique efficace doit être développée de façon urgente.

Notre objectif est de restaurer le compartiment de lymphocytes T régulateurs déficient par l'administration d'un vecteur viral. Au préalable, nous proposons de tester cette approche sur un modèle animal de souris présentant la même pathologie afin de vérifier si les cellules corrigées par transfert de gène peuvent guérir la maladie de manière définitive. La mise en place d'essais précliniques sur des modèles animaux est indispensable pour pouvoir envisager un passage en clinique sur les patients atteints. La souris Scurfy est un modèle de choix qui mime le syndrome IPEX. Ces souris présentent une mutation spontanée du gène *Foxp3* aboutissant à l'absence de Treg, l'installation d'atteintes auto-immunes dès 8-10 jours de vie et le décès à 3-4 semaines. Nous allons développer un vecteur viral de grade clinique. Ce vecteur permettra d'apporter une copie fonctionnelle du gène *FOXP3* au sein des lymphocytes de patients afin de restaurer leur fonction régulatrice. Ces lymphocytes T corrigés seront ensuite administrés au patient par simple perfusion. Le modèle murin Scurfy sera utilisé dans la mise au point de la stratégie thérapeutique par thérapie génique (requis par l'ANSM). Le nombre de souris utilisée sera de 235 souris Scurfy et 30 souris sauvages.

Pour respecter le principe des 3 R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Afin de limiter la souffrance et l'angoisse des animaux, une surveillance quotidienne sera mise en place, des antalgiques seront prévus. Toutes les manipulations susceptibles d'induire une douleur chez l'animal seront précédées par une anesthésie générale. De plus des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Le milieu sera enrichi.

Le nombre d'animaux utilisés sera de 265 souris pour une étude sur 5 ans.

L'objectif de cet amendement est tout d'abord de permettre la mise au point d'une stratégie d'immunosuppression pour assurer la guérison de la pathologie par l'injection de lymphocyte régulateur. Ce traitement permettra de contrôler les lésions avant l'injection des cellules régulatrices afin de favoriser leur bénéfice thérapeutique. Enfin, nous évaluerons l'impact de cette stratégie sur la réponse immunologique des souris. Ainsi, 2 procédures sont ajoutées incluant 144 animaux supplémentaires sur 2 ans. Pour respecter le principe des 3 R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Afin de limiter la souffrance et l'angoisse des animaux, une surveillance quotidienne sera mise en place, des antalgiques seront prévus. Toutes les manipulations susceptibles d'induire une douleur chez l'animal seront précédées par une anesthésie générale. De plus des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Le milieu sera enrichi. Ce projet est prévu pour une durée de 5 ans.

16133 La maladie de Dent est une pathologie rénale héréditaire caractérisée par une augmentation de la perte urinaire en protéines et en calcium. Son évolution implique fréquemment l'apparition de cristaux de calcium dans le tissu rénal et dans les voies urinaires causant ainsi des calculs rénaux. La maladie aboutit généralement à l'insuffisance rénale, autrement dit à une perte de fonctionnalité des reins. A l'heure actuelle, il n'existe aucune approche thérapeutique et les traitements proposés sont seulement symptomatiques.

A l'origine de la maladie de Dent se trouvent des mutations génétiques affectant le gène *CLCN5* permettant la création d'une protéine appelée CIC-5. Cette protéine CIC-5 est majoritairement présente dans une partie du rein appelée le tubule proximal, dont le dysfonctionnement explique une grande partie du tableau clinique observé chez les patients.

Toutefois l'évolution de la maladie de Dent reste incomprise. Elle pourrait impliquer une forme de stress métabolique des cellules du tubule proximal de type « stress oxydatif ». Ce stress serait lié à l'accumulation dans les cellules des patients de la protéine CIC-5 sous sa forme mutée et non-fonctionnelle.

Notre projet est donc focalisé sur l'étude de l'état de stress des cellules du tubule proximal de souris exprimant un type de mutation courant de *CIC-5*. Pour cela, nous avons établi une lignée de souris génétiquement modifiées portant la mutation N340K du gène *CLCN5*. La lignée sera utilisée à l'aide d'un élevage raisonné permettant d'établir l'implication de stress cellulaires dans leur phénotype rénal. 206 souris seront utilisées pour ce projet sur une durée de 5 ans. Ce nombre prend en compte les exigences de la règle de remplacement, de réduction et de raffinement. Il est réduit au minimum et incompressible car seul un modèle de souris nous permettra de répondre à nos questions. De plus,

afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière 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.

A terme, nos conclusions et notre modèle animal offriront la possibilité de développer des stratégies thérapeutiques pertinentes pour la maladie de Dent.

16134 La cicatrisation est un ensemble de processus permettant la réparation d'un tissu suite à une lésion. Elle se décompose en quatre phases : inflammation (gonflement et recrutement de cellules immunitaires), réépithélialisation (création d'une nouvelle couche de tissu), vascularisation (création de nouveaux vaisseaux sanguins) et fibrose (comblement de la lésion par des fibres de collagènes). Une mauvaise cicatrisation de la peau accroît les risques d'infection et de formation excessive de tissu cicatriciel. Ce problème est fréquent chez les personnes âgées ou atteintes de maladies chroniques telles que le diabète ou les maladies cardiovasculaires. Il y a un réel besoin de comprendre comment les tissus et le système immunitaire interagissent pour contrôler les différentes étapes de la cicatrisation. Cela permettra d'identifier des stratégies de traitement des patients ayant une cicatrisation anormale voire d'améliorer la cicatrisation normale chez tout le monde.

La cicatrisation est contrôlée en partie par des cellules immunitaires résidentes de la peau : les macrophages. Normalement, ces macrophages réparent les tissus et les nettoient de leurs cellules mortes : ils sont appelés « M2 ». Lors d'une blessure, ils perdent ce statut et deviennent inflammatoires : ils sécrètent des molécules qui tuent les microbes mais qui occasionnent également des dommages collatéraux au tissu environnant. Une bonne réparation du tissu nécessite donc que les macrophages redeviennent « M2 ».

Les basophiles sont des cellules immunitaires sanguines capables de sécréter des molécules pro- « M2 » qui induisent des macrophages « M2 » dans la peau. Mais les basophiles sécrètent également d'autres molécules, elles pro-inflammatoires, qui favorisent les macrophages inflammatoires et la fibrose. Des expériences préliminaires nous ont permis d'observer que des basophiles produisant des molécules infiltraient la peau pendant les trois premières semaines du processus de cicatrisation. Cela nous laisse penser que les basophiles ont un rôle à jouer dans la cicatrisation.

Le but de ce projet est de déterminer les conséquences de la sécrétion de molécules pro- « M2 » ou pro-inflammatoires par les basophiles sur les macrophages « M2 » au cours des différentes phases de la cicatrisation (inflammation, réépithélialisation, vascularisation et fibrose). Nous vérifierons également par quels mécanismes les basophiles sont recrutés puis activés dans la cicatrice. Cela permettra d'affiner notre connaissance du contrôle qu'exerce le système immunitaire sur la cicatrisation, et ainsi de mieux comprendre pourquoi la cicatrisation peut être défectueuse.

REGLE DES 3R :

REMPACER : La cicatrisation est finement contrôlée par une interaction entre le tissu lésé, les vaisseaux sanguins, et les cellules du système immunitaire, qu'il est impossible de comprendre dans sa globalité et sa complexité sans l'observer chez l'être vivant.

REDUIRE : Un total de 428 animaux sur 5 ans sera suffisant pour mener ce projet à terme. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque oreille sera analysée comme un individu unique, ce qui permettra de doubler le nombre de points expérimentaux par souris. Les expérimentations seront réalisées en différentes phases séquentielles : si une phase ne présente aucun résultat significatif, le reste du projet sera remanié ou abandonné. De plus, pour tous les cas où cela est possible, un groupe contrôle sera partagé entre deux expériences différentes. Des expériences préliminaires seront réalisées pour déterminer la cinétique précise des points-clés de ce modèle. Cela nous permettra d'analyser uniquement le pic des réponses considérées (inflammation, réépithélialisation, vascularisation et fibrose) par la suite. L'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiées au niveau de leurs basophiles permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats significatifs statistiquement, en comparaison à l'utilisation de méthodes classiques plus invasives, moins sensibles, ou nécessitant plus de contrôles. Le nombre total d'animaux a été défini comme étant le nombre minimum requis pour pouvoir observer un effet statistiquement significatif à la totalité des expériences définies au sein de ce projet.

RAFFINER : Nous pouvons étudier la cicatrisation en réalisant un poinçon stérile de 2mm de diamètre sur l'oreille des souris. Cette procédure légère est couramment utilisée pour identifier les animaux en animalerie, ou pour faire des micro-prélèvements de peau humaine. Dans le but d'éviter de générer toute forme de douleur, cette procédure sera réalisée sous anesthésie générale. La cicatrisation (inflammation, réépithélialisation, revascularisation, fibrose), le recrutement et le profil des basophiles et des macrophages et leur sécrétion de molécules peuvent être facilement observés par différentes techniques. Des modèles de souris modifiées au niveau des basophiles (déficientes ou dont les basophiles ne peuvent exprimer certains facteurs) permettront d'apporter des réponses précises à nos hypothèses en évitant d'utiliser des méthodes invasives. Les prélèvements de sang se feront uniquement post-mortem, avant de prélever d'autres organes. Différentes mesures de cicatrisation de la peau seront réalisées sur les mêmes échantillons, afin de rationaliser l'utilisation des souris. Une banque d'échantillons de la peau sera congelée afin de pouvoir être réanalysée ultérieurement, et ainsi bénéficier à d'autres projets.

Nous étudierons l'influence des basophiles sur les 3 premières semaines de cicatrisation de la peau. Les interventions expérimentales sur animaux vivants se limiteront à l'administration quotidienne (orale ou intrapéritonéale) de traitements connus à des doses inoffensives, pour au maximum quatre jours consécutifs. Le bien-être de tous les individus sera relevé quotidiennement pendant ces traitements à l'aide d'une grille d'évaluation incluant une mesure de poids. Tout signe évident de mal-être sera considéré comme point-limite entraînant l'arrêt des expérimentations pour les individus concernés. Tous les animaux seront euthanasiés en fin de procédure, et leurs organes analysés. 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 plastique) permet d'optimiser le bien-être des animaux. Même si aucune des procédures ne doit induire de souffrance/mal-être manifeste de l'animal, en cas d'observation de tels signes les animaux concernés seront euthanasiés immédiatement.

16135 Projet pédagogique d'initiation aux techniques chirurgicales pour les internes en chirurgie nouvellement nommés avant qu'ils n'intègrent les services hospitaliers.

L'objectif du projet est de permettre aux internes nouvellement nommés d'être sensibilisés à leur future fonction. Le stage d'une semaine, par groupe de 24 étudiants, brassera l'ensemble des disciplines chirurgicales.

La formation sera essentiellement pratique. Le programme proposé fait partie du programme de la phase socle tel que défini au plan national.

Ainsi les étudiants seront amenés à réaliser des actes chirurgicaux basiques et fréquents via différents supports :

- a) supports inertes : tubes en silicone, prothèses diverses

- b) mannequins : mannequins en plastique

- c) simulateur électronique : simulateur d'endoscopie, d'arthroscopie

- d) des pièces anatomiques de porcs : tissus d'animaux provenant d'abattoirs ou prélevés sur des porcs euthanasiés utilisés précédemment dans d'autres procédures (pieds de porc, cuisses de dinde, intestins grêle, mésentère et appareils urinaires de porc)

- e) des sujets anatomiques humains

- f) porcs vivants anesthésiés : les étudiants finiront leur stage par 3 ateliers sur porcs vivants anesthésiés : atelier de coeliochirurgie, atelier de chirurgie urologique et atelier de chirurgie cardio-thoracique.

Ce programme pédagogique progressif, depuis le support inerte jusqu'à l'animal anesthésié, sera répété pendant 4 semaines afin que l'enseignement soit suivi par une centaine de jeunes internes environ.

L'objectif de la formation sur animaux vivants est de confronter les jeunes internes à la complexité de la gestuelle chirurgicale. La chirurgie sur animal vivant sous anesthésie générale permettra à l'étudiant d'appréhender la gestuelle chirurgicale de base, simulant une situation au plus proche de celle

rencontrée au bloc opératoire humain et de savoir réagir face à un évènement imprévu et d'urgence vitale.

L'utilisation du modèle porcin se justifie par les similitudes anatomiques à l'homme.

Ainsi, pendant ce stage les jeunes internes en chirurgie auront 3 ateliers de 3 heures sur le porc vivant anesthésié.

Il y aura un encadrant (référent de la discipline enseignée) par groupe de 4 étudiants.

Un enseignement théorique de sensibilisation à l'expérimentation animale (Evolution de la réglementation, le bien-être animal) leur sera donné avant les ateliers, lors de la journée préparatoire qui rassemble l'ensemble des nouveaux internes.

Pour chaque opération les animaux seront sous anesthésie générale et analgésie adaptées à l'acte chirurgical. Des points limites ont été soigneusement définies pour chaque procédure. En fin de procédure, les animaux étant sous anesthésie générale profonde, recevront une dose létale d'euthanasiant.

Pour bien sensibiliser les apprenants aux gestes de base et d'urgence tout en limitant le nombre d'animaux, nous avons prévu par poste de travail : 1 porc pour 4 étudiants et 1 encadrant. Il y aura 2 fois 4 postes de travail par atelier. Il y a 3 ateliers/semaine soit 8 fois 3 = 24 porcs/semaine. Le programme étant répété pendant 4 semaines, le nombre de porcs estimé est de 96 porcs par année universitaire.

Au total, sur 5 ans, le nombre estimé de porcs est de 480. Ce nombre sera fonction du nombre d'étudiants/an (numerus clausus). Il pourra également être moins important si de nouveaux simulateurs plus performants sont créés.

16136 Le protocole suivant concerne l'alimentation du chien et du chat. Il est réalisé dans le but de prouver l'adéquation entre l'exigence nutritionnelle de chiens ou de chats adultes en phase de maintien et un régime inhabituel selon sa composition nutritive ou incorporation d'ingrédients tels que de nouvelles sources de protéines par exemple.

Le développement de formules spécifiques peut nécessiter le recours aux besoins nutritionnels minimum. Dans un tel cas, le protocole vérifie si le régime fournit le niveau approprié de substances nutritives disponibles car bien que les minimas nutritionnels soient suivis, la disponibilité nutritive n'est pas toujours bien connue.

L'étude dure jusqu'à 32 semaines selon les besoins. Pendant l'étude, les chiens et les chats sont suivis cliniquement, pour leur poids corporel, qualité de leurs selles et l'état du pelage ainsi que pour leurs paramètres sanguins (biochimie, des hormones...). Une mesure sera effectuée par semaine.

La réalisation de ces évaluations impliquera un maximum de 60 chiens et 60 chats sur l'ensemble du projet. L'utilisation de chien et chat spécifiquement entraînés et adapté à nos installations et faisant l'objet d'un suivi très régulier permet de réduire significativement le nombre d'individu nécessaire.

Les chiens et chats participants à ce projet suivent des programmes spécifiques d'entraînement, d'éducation, de socialisation et d'activités quotidiennes. Ces programmes, revue par le comité bien être, permettent d'optimiser le bien-être de nos animaux.

16137 La digestion et la régulation du métabolisme énergétique sont possibles notamment grâce aux cellules endocrines présentes dans l'intestin et le pancréas, qui produisent différentes hormones, comme l'insuline. 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 afin de comprendre comment ces cellules sont produites, en particulier dans l'intestin où elles constituent une population très diverse sécrétant une multitude d'hormones, et comment elles sont capables d'assurer leurs fonctions tout au long de la vie. Ces études devraient permettre à terme de mieux cerner les différentes pathologies et de proposer de nouvelles thérapies. Dans le but de mieux comprendre la physiopathologie des cellules endocrines intestinales, également appelées cellules entéroendocrines (EE), chez l'Homme, nous avons récemment mis au point la culture tridimensionnelle de mini-intestins humains *in vitro*, générés à partir

de cellules souches pluripotentes induites, modifiées génétiquement ou non. Cependant, bien que ces mini-organes (ou organoïdes ou HIOs pour Human Intestinal Organoids) aient déjà permis de répondre à un certain nombre de questions, leur maturation *in vitro* reste limitée à celle d'intestins embryonnaires qui ne sont pas pleinement fonctionnels, en particulier regardant le développement des cellules EE et la production d'hormones. Une technique de choix pour obtenir la croissance et la maturation des HIOs consiste à les transplanter sous la capsule rénale de souris NSG (lignée immunodéprimée qui tolère des greffes) où leur développement est facilité grâce à l'apport sanguin fourni par la vascularisation de l'hôte. Les transplants présentent alors des fonctions de digestion et d'absorption ainsi que des réponses physiologiques très proches de celles observées dans l'intestin humain adulte. Nous souhaitons donc réaliser ce type de transplantation en mettant en œuvre des protocoles bien établis, utilisés couramment par un de nos collaborateurs et pour lesquels nous pourrions bénéficier d'une formation. Cette formation pourra être réalisée sur des souris de réforme de la zone SPF (8-10 souris soit 2 par expérimentateur) qui seront sacrifiées au bout de la procédure. Nous veillerons à utiliser toutes les procédures pré- et post-opératoires nécessaires au bien-être animal : asepsie, anesthésie, traitement antibiotique afin d'éviter les infections microbiologiques, et analgésique pour éviter la douleur, suivi quotidien. Les souris NSG transplantées seront sacrifiées au bout de 6 à 8 semaines, temps nécessaire au bon développement des greffons, qui seront alors prélevés pour réaliser des analyses histologiques, biochimiques et de biologie moléculaire. Le nombre estimé de souris NSG qui seront transplantées (110 sur une période de 5 ans) prend en compte les différents types d'organoïdes greffés (mini-intestins ayant différentes modifications génétiques dans les gènes responsables de la destinée ou de la fonction des cellules endocrines), les pertes éventuelles suite aux procédures chirurgicales, ainsi que les analyses statistiques qui seront effectuées. En effet, par gène étudié, un test statistique approprié tel que le test non paramétrique de Mann-Whitney, applicable dans ce type d'étude, nécessite un minimum de 4 à 5 échantillons par génotype (comparaison de 4-5 transplants modifiés génétiquement à 4-5 transplants témoins non modifiés). La transplantation des HIOs représente un atout considérable pour étudier et comprendre la physiopathologie des cellules entéroendocrines humaines, qui à ce jour, ne peut être remplacée par un système *in vitro*.

16138 Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent. Les facteurs génétiques ont longtemps été suspectés d'être les seuls responsables de cette pathologie. Cependant, depuis quelques années, la flore intestinale appelée aussi microbiote retient de plus en plus l'attention. En effet, il a été remarqué que les patients atteints d'un CCR présentent une dysbiose, c'est-à-dire une modification de la composition du microbiote intestinal. Parmi les centaines d'espèces bactériennes composant le microbiote intestinal, les *Escherichia coli* sont fortement suspectés de participer au développement du CCR. En effet, les tumeurs colorectales sont colonisées à haute fréquence par des *E. coli*. De plus, l'analyse génomique des *E. coli* associés aux tumeurs révèle qu'elles possèdent très souvent des toxines. A l'heure actuelle l'impact de ces toxines sur le développement du CCR reste très mal connu. Le projet a pour but de mieux comprendre le rôle éventuel de ces toxines en utilisant un modèle murin de CCR.

Des études menées *in vitro* nous ont permis de tester une collection de souches d'*E. coli* isolées de tumeurs colorectales et d'identifier une souche de référence qui sera utilisée chez l'animal.

Sur la durée du protocole (5 ans), nous utiliserons un maximum de 510 souris.

Notre démarche s'inscrit dans le cadre de la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Nous ne pouvons pas nous passer de l'expérimentation animale car aucune méthode alternative n'existe pour étudier/comprendre l'impact des toxines d'*E. coli* sur la tumorigenèse colorectale. De plus, afin d'optimiser l'utilisation de chaque animal, un maximum d'échantillons sera prélevé puis analysé. 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 plastique ainsi que des galets de carton de manière à ce que les animaux puissent se faire un nid. 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 20% ; un dos voûté, un poil dru ou une démarche traduisant un mal être; du sang dans les fèces ou de la diarrhée.

16139 Notre alimentation est contaminée par de très nombreux polluants, notamment des polluants organiques comme les dioxines, les furanes, d'autres composés organiques chlorés et des composés bromés. Ces polluants sont stockés dans la masse grasse de l'organisme et peuvent persister de très nombreuses années (ils sont ainsi appelés Polluants Organiques Persistants ou POPs). Le tissu adipeux exerce donc un rôle protecteur vis à vis des autres organes en captant les POPs après une exposition à ces derniers, mais est toutefois susceptible de les relarguer chroniquement (comme un « réservoir de POPs ») avec pour conséquences potentielles des modifications du métabolisme de l'individu pouvant conduire à des pathologies. En outre, plusieurs études épidémiologiques suggèrent que des POPs dont les dioxines et les PCBs favorisent le développement de ces pathologies (diabète, syndrome métabolique...). Nous proposons dans le présent projet, 1) d'étudier spécifiquement l'activité de relargage de POPs par le tissu adipeux (TA) et ses conséquences métaboliques et inflammatoires, ainsi que 2) de caractériser et de modéliser les flux de ces POPs au niveau du TA.

Ce projet explore un modèle unique de relargage de POPs dans la circulation et ces retentissements. Il apporte des informations variées (de la modélisation au métabolisme) mais complémentaires sur le rôle du tissu adipeux dans l'exposition chronique interne aux POPs. Nous espérons qu'il fournira des données fiables qui pourront être extrapolés à d'autres conditions de contamination pour lesquelles il est impossible de réaliser le même type d'étude, et plus globalement, aux contaminations à long terme qu'il est difficile d'explorer chez l'Homme.

Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, impliquera l'utilisation de souris (nombre d'animaux maximal = 576).

Pour respecter le principe des 3R (réduire, raffiner, remplacer), nous nous servirons de nos premiers résultats afin d'optimiser et de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour chaque groupe.

De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, un enrichissement des cages (une niche) sera mis en place et les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

16140 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.

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 devons avoir recours au modèle animal.

Des résultats préliminaires nous ont indiqué que l'atrophie tubulaire induite par la délétion de HNF1B est précédée par une activation très précoce de l'expression de la cycline D1. Cet événement pourrait jouer un rôle clef dans l'apoptose et la senescence qui caractérisent les reins des souris déficientes en HNF1B. Pour étudier l'implication mécanistique de la cycline D1 nous souhaitons administrer des inhibiteurs de la cycline D1 pour essayer d'atténuer le dysfonctionnement rénal lié à la perte de HNF1B.

Ce projet nécessitera au total 80 souris utilisées dans 2 procédures :

- Inactivation du gène *Hnf1b* par gavage au tamoxifène

- Administration d'un inhibiteur de la cycline D1 par gavage.

Afin de respecter le principe des 3R, nous avons adopté une molécule inhibitrice qui est déjà utilisée en clinique après avoir été testée dans plusieurs modèles animaux et cellulaires. A ce jour aucune toxicité a été rapportée.

D'autre part, il a été démontré que la validité de l'analyse statistique de la biochimie sanguine et urinaire requiert un minimum de 10 animaux par groupe. C'est donc cette valeur que nous nous sommes fixée pour cette étude. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous analyserons plusieurs paramètres sur le même animal. Dans un souci de raffinement, les animaux seront surveillés quotidiennement tout au long de la procédure et des points limites ont été établis permettant d'anticiper la mort de l'animal en cas de souffrance. 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.

16141 Avec la prévalence croissante des maladies cardiovasculaires, la mise en place de prothèses/greffes vasculaires a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Cependant, ces prothèses vasculaires ne viennent pas sans complications car elles s'accompagnent d'un risque d'infection de 1% à 6%. Ces infections sont associées à des taux de mortalité supérieur à 20%, ce qui en fait des complications très graves. *Staphylococcus aureus* est l'un des principaux agents impliqués dans l'infection des prothèses vasculaires car il adhère facilement à la surface du dispositif implanté et forme un biofilm (bactéries s'accrochant aux matériaux qui forment un bouclier résistant à l'hôte et aux antibiotiques). Ce biofilm est difficile à détecter car il est souvent non accompagné par des symptômes. Malgré la mise en œuvre de mesures préventives, les biofilms sont difficiles à éradiquer en raison de leur tolérance caractéristique à des doses élevées d'antibiotiques.

Au sein de ces biofilms, les bactéries sont protégées des réponses immunitaires de l'hôte et des traitements antibiotiques. La conséquence clinique est que le biofilm constitue une source principale pour les infections chroniques récurrentes (à répétition) et qu'il n'y a pas de traitement curatif. Le dispositif implanté doit généralement être retiré chirurgicalement, ce qui implique des interventions invasives supplémentaires pour le patient et des coûts élevés pour le système de santé.

De nombreuses recherches sont en cours pour découvrir des moyens d'empêcher les bactéries d'adhérer à la surface en premier lieu ou de trouver de meilleures méthodes d'administration qui permettraient aux antibiotiques d'éradiquer les bactéries cachées dans le biofilm.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les propriétés antibactériennes d'implants résistants aux infections sur une infection sous cutanée par des bactéries *Staphylococcus Aureus* en comparaison à des implants contrôles. Le rôle de ce nouvel implant sera donc de prévenir l'adhésion des bactéries et donc les biofilms.

De nombreux modèles *in vitro* ont été mis en place pour étudier la formation du biofilm. Ces modèles ont fourni des informations utiles à la formation du biofilm et les mécanismes par lesquels un biofilm est maintenu. Cependant, les interactions hôte-pathogène sont importantes et nécessitent une étude *in vivo*.

- Remplacer : Les données manquantes sur les propriétés antimicrobiennes ne peuvent être menées que sur l'animal entier vivant : la réaction inflammatoire, hémostatique et hémodynamique sont des processus vivants et dynamiques, mettant en jeu des mécanismes complexes qui ne peuvent être reproduits *in vitro*.

- Réduire : Des études *in vitro* ont été menées au préalable afin de sélectionner les formulations d'implants les plus intéressantes à tester *in vivo* pour réduire au maximum le nombre de tests et le nombre d'animaux. De plus des études bibliographiques ont été menées afin de choisir au mieux la souche bactérienne et sa concentration.

- Raffiner : 90 souris seront incluses dans l'étude. Tout le projet sera conduit dans des locaux agréés, avec du personnel dédié et expérimenté. Un protocole précis de prémédication, d'analgésie,

d'anesthésie est mis en place. Les souris auront une période d'acclimatation d'au moins une semaine avant l'implantation. Elles seront hébergées dans une animalerie conventionnée, avec eau et alimentation ad libitum, dans des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées, avec un cycle jour/nuit de 12h.

L'inoculation de bactéries et la mise en place des implants seront réalisés sous anesthésie générale avec analgésie préopératoire et post-opératoire par un vétérinaire spécialiste européen en chirurgie.

Les animaux seront observés quotidiennement : état général, alimentation, abreuvement, nettoyage, morbidité et mortalité.

En cas d'animal considéré comme anormal, la personne en charge des observations :

-manipulera l'animal pour confirmer ou infirmer cet état

-Toutes anomalies cliniques seront signalées au vétérinaire pour un examen clinique complet si nécessaire.

La douleur et le bien-être sont évalués selon des paramètres précis. En cas de signe de douleur importante, des antalgiques seront administrés jusqu'à disparition des signes. Si une souffrance et/ou une détresse de l'animal est mise en évidence, des mesures seront directement mise en place : fin de la procédure, traitement afin de soulager la souffrance.

16142 Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune caractérisée par la production d'auto-anticorps (anticorps dirigés contre l'organisme), associée à une inflammation qui peut toucher différents organes. Les traitements actuels (immunosuppresseurs, anti-inflammatoires) sont source de nombreux effets indésirables et ne permettent pas de guérir du lupus. L'objet de nos études est de comprendre les mécanismes aboutissant au développement de cette maladie et de développer des thérapies permettant de cibler certaines des atteintes les plus graves. Nous nous intéressons particulièrement à la réponse immunitaire anormale observée au cours du lupus et avons identifié des cibles potentiellement impliquées dans le développement de la maladie. Les souris NZB/W développent spontanément au cours du temps plusieurs symptômes de la maladie lupique que l'on retrouve également dans la pathologie humaine. Nous voulons poursuivre dans cette voie en continuant d'une part à caractériser les réponses anormales chez ces souris afin d'autre part, de développer des cibles thérapeutiques. Nous testerons l'injection répétée de molécules à visée thérapeutique chez des souris lupiques NZB/W à différents stades de la maladie (ne présentant pas encore de signe de la maladie, présentant une pathologie modérée et chez des souris NZB/W malades). Pour réaliser ce projet, nous utiliserons un total de 2400 souris. Ce nombre total a été calculé de façon à respecter au mieux la règle de réduction des 3R. En effet, pour compenser l'hétérogénéité inhérente aux animaux et pour caractériser des populations cellulaires rares dans les organes lymphoïdes, nous avons besoin d'un nombre minimum de 3 animaux par expérience (expérience visant à étudier la réponse immunitaire au cours du développement de la maladie) ou 10 animaux par expérience (expérience visant à évaluer le potentiel thérapeutique de nos molécules candidats). Afin d'obtenir un résultat exploitable, nous utiliseront des tests statistiques adaptés à un faible nombre d'échantillons. Pour répondre à la question du raffinement, les souris seront hébergées par groupes et les cages seront enrichies avec l'ajout de matériel permettant aux souris de construire un nid. De plus, elles seront anesthésiées avant chaque prélèvement sanguin. Les souris seront manipulées par des personnes compétentes et formées à l'expérimentation animale. Enfin, un tableau de détermination des points limites (indicateur précoce de douleur ou détresse de l'animal) est mis en place : ceci consiste à vérifier de manière quotidienne un certain nombre de paramètres pour évaluer le bien-être de l'animal (mesure du poids, évaluation de l'apparence et de la réactivité de l'animal, de l'interaction avec son environnement, etc.). Des points limites sont fixés et si un paramètre dépasse ce seuil d'acceptabilité éthique, l'animal sera soustrait des procédures. Nous ne pouvons pas, ici, assurer la règle du remplacement. En effet, les études ne peuvent en aucun cas être réalisées *in vitro* car il s'agit d'une maladie auto-immune systémique chez l'animal comme chez l'Homme, les études nécessitent donc l'animal entier.

16143 L'hémostase est un processus physiologique qui permet l'arrêt du saignement. Suite à une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent au site de lésion pour former un agrégat qui bouche la brèche

vasculaire. La coagulation est alors activée et elle va conduire à la formation de fibrine, un réseau protéique insoluble, qui stabilise le caillot, permettant ainsi l'arrêt de l'hémorragie. Chez certains patients, un défaut lié aux plaquettes ou de la coagulation peut entraîner des saignements majeurs qui peuvent être très dangereux pour le patient. Il est donc capital de parfaitement comprendre les étapes menant à l'arrêt du saignement. Si le rôle des plaquettes et de la coagulation sont relativement bien connus, l'importance du flux sanguin lors du processus de l'hémostase reste mal appréciée.

L'objectif principal de ce projet est de caractériser la nature de l'écoulement apparaissant au niveau des plaies dans des modèles d'hémostase. En effet, la caractérisation physique du flux sanguin, apparaissant au niveau des brèches vasculaires, peut expliquer la structure unique des thrombi formés au cours du temps. Nos simulations numériques préliminaires ont permis d'identifier des vitesses d'écoulement cent fois supérieures à celles supposées décrites dans la littérature. Nous souhaitons confirmer la présence de flux rapide au niveau d'une lésion vasculaire par des mesures de l'écoulement sanguin chez l'animal. Ces données sont importantes pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'arrêt du saignement. En effet, certains récepteurs plaquettaires fonctionnent mieux en condition de flux lent et d'autres en conditions de flux rapides.

Limitation du nombre d'animaux :

Remplacement : Le but de ce projet est de caractériser les flux sanguins qui surviennent lors de différents types de lésions traumatiques des vaisseaux sanguins, en complément d'une étude par simulation déjà réalisée par des collaborateurs. Dans le cadre de cette étude, il est impossible de substituer la souris à d'autres modèles, car il n'existe pas de modèle permettant de mesurer les flux sanguins *in vitro*. 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 12 souris/groupe au maximum pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. De plus, l'utilisation d'un modèle de simulation a permis de réduire le nombre de conditions d'analyse de la structure des thrombi à 5 types de vaisseaux et à 1 blessure/vaisseau. Cela permet a permis de diminuer par cinq le nombre d'animaux utilisé lors de ce projet.

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 bien-être, les animaux sont maintenus en groupes sociaux, dans des cages munies de particules de bois et enrichies avec des carrés de cellulose, des bâtonnets de coton de la frisure de papier et de la nourriture est posée au sol. Cela permet aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux. Ils peuvent aussi accomplir leur comportement de recherche de nourriture. Ils ont un accès permanent à la nourriture et à l'eau de boisson.

Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale, avec maintien de la température à 38°C par l'utilisation d'une plaque chauffante (tout au long de la procédure). Un traitement approprié contre la douleur leur sera administré. La durée maximale de l'expérimentation sera de 30 minutes.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 1230 souris.

16144 Les laboratoires de recherche privés ou académiques emploient de nombreux techniciens intervenant 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. L'objectif de ce projet est d'assurer les compétences des agents appliquant des procédures expérimentales sur rongeurs conformément à la directive 2010/63/UE et le décret du 1er février 2013 sur l'utilisation des animaux vivants en expérimentation animale. Dans le cadre du module de spécialisation rat-souris, 1 séance de travaux pratiques (4h) sera réalisée chez le rat et la souris vigile. La séance consistera à former les participants aux principales techniques faiblement invasives de préhension manuelle en vue d'administrations de sérum physiologique en mode sous cutané, intrapéritonéal, intramusculaire,

intraveineux, gavage et de prélèvement sanguin intraveineux (au niveau de la queue). Sachant que le nombre de participants est au maximum de 12 par an, le nombre total d'animaux utilisés sera de 60 rats et 60 souris sur 5 ans (total 120 animaux utilisés). La règle des 3 R sera respectée sachant que des méthodes alternatives ne sont pas disponibles en remplacement des procédures faiblement invasives dont l'apprentissage sur animal est un requis fondamental dans ce type de formation. De plus le nombre d'animaux (1 rat et 1 souris par participant) a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour assurer un apprentissage de qualité et les compétences demandées. Afin de limiter les contraintes lors des manipulations les animaux seront préalablement sédatés par inhalation d'isoflurane facilitant ainsi les procédures. Les animaux seront tous euthanasiés en fin de TP par inhalation progressive de CO₂.

16145 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 concevoir des procédures expérimentales sur des rongeurs.

Dans ce contexte, une formation niveau « conception et réalisation des procédures » a été mise en place. Cette formation en grande partie théorique, contient une partie pratique sur la souris ce qui implique un dépôt du projet décrit ci-après.

Ces travaux pratiques visent à compléter la formation théorique par la démonstration et la réalisation des gestes de contention, de prélèvement sanguin, d'administration de substance et de mise à mort de la souris.

Cette formation est organisée deux fois par an avec une session pour des étudiants en doctorat en science de la vie qui accueille une moyenne de 60 étudiants par session et une session pour des chercheurs (permanents, postdoctorants, ingénieurs et personnels techniques des organismes de recherche afin qu'ils puissent satisfaire aux obligations légales dans le cadre de leurs projet de recherche (sous réserve que ces personnes répondent aux critères de formation initiale tels que prévus par la réglementation). Cette session concerne une moyenne de 30 formés par session.

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 : Cette formation pratique débute par une partie théorique utilisant des supports vidéo afin que les stagiaires appréhendent et visualisent au mieux l'ensemble des gestes. La mise en œuvre de certains de ces gestes est nécessaire à la formation et les méthodes alternatives ne peuvent en aucun cas remplacer totalement 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. Nous avons aussi des animaux modèles en plastiques qui sont utilisés pour l'entraînement aux principaux gestes de base avant de passer sur 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.

Réduction : Lors de cette formation, le nombre de souris sera réduit à un animal par participant. L'objectif est de permettre aux participants d'acquérir les compétences 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 450 souris

16146 La douleur est un problème de santé publique majeur qui réduit la qualité de vie des patients. Les traitements aux opiacés restent le moyen le plus efficace de réduire la douleur moyenne à intense mais le développement d'une tolérance à leurs effets et d'une hypersensibilité à la douleur conduisent à la diminution de l'efficacité du traitement au fil du temps. Ces effets sont en partie dus à l'activation des systèmes anti-opioïdes, lors d'administrations chroniques.

Dans ce projet nous allons évaluer des molécules pouvant empêcher l'activation du système anti-opioïde dans un modèle murin d'administration chronique d'opioïde. L'observation de l'évolution du comportement des souris sera effectuée par la mesure de leur temps de réaction à l'immersion de leur queue dans de l'eau à 48°C.

Remplacer : Bien qu'il soit possible de disséquer les mécanismes d'action des nouveaux médicaments *in vitro*, l'adaptation des animaux à des traitements chroniques est difficile 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 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement fiable et qui évite ainsi la répétition d'expériences. Nous pensons étudier 10 molécules par an et donc sur une période de 5 ans l'utilisation de 3000 souris est envisagée.

16147 Le maintien de la balance énergétique dépend de l'équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Il existe des systèmes de régulation de la prise alimentaire qui permettent un équilibre entre les apports énergétiques, les dépenses et le maintien du poids corporel autour d'une constante. Une dérégulation du système peut conduire à l'obésité et aux maladies métaboliques qui lui sont associées. De très nombreuses études ont montré l'association positive entre obésité et diabète de type 2 (DT2).

Le DT2 est la forme la plus fréquente de diabète (90 % des cas). Il se caractérise par une augmentation du taux de sucre dans le sang (hyperglycémie), car le corps utilise mal le glucose (sucre) comme source d'énergie. Cette hyperglycémie chronique entraîne de nombreuses complications tels que des maladies cardiovasculaires, des accidents vasculaires cérébraux, la cécité, l'insuffisance rénale et des lésions nerveuses.

De nombreux gènes ont été associés à l'apparition du DT2. Cependant, leur fonction dans la survenue du DT2 est inconnue. Notre équipe de recherche s'intéresse à l'un de ces gènes identifiés dont la fonction est ignorée. Nous avons généré des souris génétiquement modifiées, dont le gène d'intérêt a été invalidé. Les données de notre laboratoire montrent que les animaux ont un poids et un apport alimentaire diminués par rapport aux animaux témoins après 5 mois de régime riche en gras. Ces diminutions sont associées à une amélioration de la glycémie des souris. Nous émettons l'hypothèse que ce gène pourrait être impliquée dans le maintien de la balance énergétique et la dérégulation de son expression pourrait contribuer ainsi au développement du DT2.

Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons le même modèle de souris génétiquement modifiées que précédemment, dans lequel le gène d'intérêt est invalidé. Par contre, l'invalidation du gène sera effectuée dans tous les tissus de l'animal pour préciser les résultats obtenus précédemment mais aussi spécifiquement dans le cerveau (centre de régulation de l'appétit et de la satiété).

Les souris seront soumises à un régime alimentaire standard ou à un régime enrichi en gras afin d'induire une obésité. Pour induire l'obésité chez la souris nous générerons aussi des souris modifiées génétiquement pour devenir obèses dès 8 semaines dont le gène d'intérêt sera aussi invalidé dans

tous les tissus. Ces 2 modèles nous permettront d'induire une obésité et une résistance à l'insuline caractéristiques du stade pré-diabétique chez le patient.

Remplacement : La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes complexes tels que la souris.

Réduction : Nous utiliserons un total de 312 animaux. Le nombre d'animaux testé dans chaque expérience nous permettra une comparaison statistique adaptée entre les différents groupes tout en tenant compte des impératifs de réduction. Par ailleurs, toujours par souci de réduction, plusieurs procédures expérimentales (avec un temps de récupération adaptée pour les animaux) seront réalisées chez les mêmes cohortes de souris.

Raffinement : Les animaux sont hébergés dans des cages avec un enrichissement essentiel pour leur bien-être (Coton + Carton). La litière des animaux est remplacée une fois par semaine. Les animaux sont surveillés par le personnel qualifié tous les jours. Le stress lié aux procédures nécessitant l'isolation des animaux sera diminué par l'usage de cages transparentes rendant leurs congénères visibles. Aucune douleur ou souffrance n'est attendu dans la plupart des procédures expérimentales utilisées mais l'usage d'anesthésique et d'analgésique sera systématique pour les procédures expérimentales potentiellement douloureuses. L'habituation des souris à l'opérateur aura systématiquement lieu quelques jours avant l'expérience et les différentes expériences seront réalisées par du personnel qualifié afin d'éviter le stress lié à la manipulation des animaux. Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour les analyses biochimiques et les volumes injectés seront adaptés au poids de chaque animal afin de ne pas induire de stress supplémentaire. Chaque semaine, la prise de poids, la quantité de nourriture sont mesurées permettant ainsi un suivi hebdomadaire des souris. La taille du matériel utilisé sera adaptée à la taille des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour réduire tout inconfort ou douleur qui se développerait et des points limites seront déterminés pour éviter toute souffrance animale. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé, après avis vétérinaire.

16148 Les maladies du système nerveux conduisent à des pertes irréversibles des fonctions motrices et cognitives. En effet, les neurones du système nerveux central ne sont pas capables de repousser leurs axones qui forment les nerfs. Dans la plupart des cas, cela conduit également à la mort neuronale. Puisque les neurones ne sont pas des cellules qui se divisent, leur perte est définitive et ils ne seront pas remplacés. Ainsi, lorsqu'un circuit nerveux est endommagé par la maladie (comme le glaucome, Alzheimer ou Parkinson) ou des traumatismes (lésions traumatiques de la moelle ou cerveau) le patient sera handicapé à vie. Dans notre équipe nous voulons comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à la repousse neuronale et à la survie dans le système nerveux mature. De nombreuses études *in vitro* ont mis en évidence des pistes très prometteuses. Cependant les tests *in vivo* ont échoué. En effet, dans le système nerveux plusieurs types de cellules (les neurones et les cellules gliales entre autres) cohabitent et participent à l'absence de réparation. De plus le contexte physiologique est indispensable afin d'évaluer la pertinence des voies moléculaires que nous testerons afin de promouvoir la régénérescence et la survie neuronale. Ainsi le recours à l'organisme entier est indispensable. Nous aurons recours à des souris pour ce projet puisque 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 pas remplacer les souris. Dans ce projet, nous aurons recours à 3406 animaux sur une durée de 5ans. Afin de réduire le nombre d'animaux 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.

16149 Plusieurs cas de pneumonies virales ont été décrits fin 2019 dans la ville de Wuhan en Chine. L'agent causal est un nouveau coronavirus (SARS-CoV2 ou COVID-19), qui provoque une épidémie qui se propage rapidement. Le 30 janvier 2020, l'OMS a déclaré que l'épidémie était une urgence de santé publique de portée internationale. Fin juin 2020, plus de 9 millions de personnes ont été infectées, parmi lesquelles plus de 475,000 sont mortes. En France, plus de 160,000 cas d'infections ont été confirmés à ce jour (02/03/2020) dont 29,000 décès.

Les coronavirus provoquent habituellement des infections hivernales bénignes telles que des rhumes. Toutefois, au cours des 20 dernières années, deux autres émergences d'infections respiratoires aiguës sévères ont été causées par des coronavirus : le SARS (« severe acute respiratory syndrome ») en 2003 et le MERS (« Middle East respiratory syndrome ») en 2012.

Les signes cliniques de l'infection par le virus SARS-CoV2 sont de la fièvre et de la toux. L'infection peut se compliquer de difficultés respiratoires, d'une détresse respiratoire aiguë sévère (DRAS) et d'une défaillance multiviscérale. Ces complications semblent toucher préférentiellement les personnes âgées, fragiles ou atteintes de maladies chroniques telles que le diabète et l'hypertension.

Actuellement, la communauté internationale ne dispose ni de vaccins ni de traitements contre ce virus pour contenir l'épidémie. Il est donc primordial de mettre en place rapidement les programmes de recherche pour disposer des moyens de prévenir et traiter les nouvelles infections par le SARS-CoV2.

Depuis le 30 janvier, différents projets nationaux et internationaux sont lancés et nous sommes d'ores et déjà partenaires de plusieurs d'entre eux. D'autres appels à projets sont en préparation et vont sortir très rapidement.

Le but de ce projet est d'évaluer chez le primate non-humain, l'efficacité de vaccins et de traitements contre le virus SARS-CoV2. Il est aujourd'hui impossible de reproduire *in vitro* la complexité d'une infection virale et d'une réponse immunitaire. Le recours à un modèle animal est donc nécessaire pour apporter un maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'humain. Le macaque, par sa proximité génétique avec l'être humain, est le modèle le plus pertinent. De plus, l'infection du macaque par d'autres coronavirus reproduit effectivement les symptômes observés chez l'humain. Certains des vaccins et traitements qui seront testés ici ont déjà été utilisés chez le PNH dans le cadre d'autres maladies.

Les étapes de ce projet sont donc :

- d'établir un modèle d'infection par le SARS-CoV2 reproduisant les symptômes humains chez le macaque et le babouin;
- d'évaluer l'innocuité des candidats vaccins, la réponse immunitaire qu'ils induisent ainsi que leur efficacité à protéger les animaux vaccinés contre l'infection par le SARS-CoV2;
- d'évaluer l'efficacité de traitements antiviraux permettant de réduire les symptômes et donc la dangerosité de l'infection par le SARS-CoV2.

Le projet prévoit de tester au minimum 10 vaccins candidats et 7 traitements. Pour cela, il est prévu d'utiliser au maximum 305 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu sur une durée de 5 ans (soit en moyenne 61 animaux/an). Ce nombre prend en compte les différents scénarios du projet. Il est donc attendu que, potentiellement, moins d'animaux soient utilisés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. 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 virus et injections des vaccins réalisés sous anesthésie générale, pose de puces électroniques de suivi de la température). Les critères d'arrêt sont prévus dans le projet en cas de progression de la maladie ou d'éventuels effets inattendus du vaccin et des molécules thérapeutiques. Les vétérinaires de l'installation seront alertés et mettront en œuvre des traitements en adéquation avec l'expérience. Les animaux seront hébergés en groupe lors des phases

d'immunisation et en individuel dans des modules contigus permettant des interactions sociales lors de la phase d'infection aiguë (durée attendue d'une quinzaine de jours). Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie et qui sera renforcé lors des phases d'hébergement individuel.

16150 Les impulsions électrostatiques ultracourtes sont des impulsions de quelques dizaines de nanosecondes utilisées depuis longtemps pour l'électroporation (appelée aussi électroperméabilisation, c'est une technique qui consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires qui sont ainsi déstabilisées, ce qui augmente la perméabilité membranaire). Notre travail fait suite à une longue étude de leur effet *in vitro* sur les cellules immunitaires humaines.

La littérature récente a bien établi l'action de ces impulsions *in vivo* sur différents types de cancers sur des modèles animaux, d'abord pour provoquer l'apoptose des cellules tumorales (mort programmée), mais également, très récemment sur des tumeurs mammaires de souris, pour induire un effet immunitaire adaptatif agissant sur les métastases à distance de la zone de traitement, entraînant une guérison définitive.

Contrairement à ces expérimentations, qui sont invasives, avec implantations d'électrodes transcutanées, nous proposons de travailler avec des électrodes de surface.

Le programme de recherche s'attache à déterminer les paramètres optimaux pour obtenir l'effet immunitaire permettant d'obtenir la guérison : l'amplitude et la fréquence de l'impulsion, sa durée, sa forme et sa polarité, et la durée du traitement. Le critère de jugement principal sera l'évolution de la croissance tumorale. Parallèlement, il permettra d'analyser finement l'évolution tumorale par échographie, ainsi que les effets immunitaires induits. Nous utiliserons la même tumeur mammaire que dans la littérature.

Les bénéfices attendus concernent à court terme les études sur le petit animal, en proposant une méthode non invasive et non douloureuse par rapport aux publications récentes et qui pourra être transposée très rapidement en clinique humaine, où la mise en place d'un dispositif réalisant une effraction tumorale, avec risque de dissémination métastatique, est éthiquement très discutable. A moyen terme, les applications cliniques devraient permettre d'améliorer le pronostic du cancer de manière très significative, tout en simplifiant les modalités de traitements.

Au total, nous prévoyons d'utiliser 140 souris. Ce nombre d'animaux permet de couvrir l'ensemble de l'étude sur 2 ans. Le traitement doit permettre une diminution de la croissance tumorale jusqu'à une disparation de la tumeur et des symptômes induits. Les dommages attendus sont ceux liés à la croissance de la tumeur pour les groupes non traités.

Un protocole analgésique est prévu en cas d'apparition de douleurs avant le point limite. Des points limites adaptés sont mis en place et contrôlés chaque jour pour chaque animal.

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 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 du système immunitaire complet confronté au développement d'un cancer (remplacer).

16151 De nombreuses études ont prouvé le rôle des probiotiques dans le maintien d'une bonne santé digestive mais également dans la régulation des réactions inflammatoires, métaboliques et immunitaires de l'organisme ce qui a conduit à envisager leur utilisation dans le traitement de différentes affections. Un récent rapport de l'Académie Nationale de Médecine souligne l'importance du microbiote intestinal et son implication dans la genèse d'affections variées comme l'obésité, les maladies inflammatoires digestives ou certains cancers. Il évoque également la nécessité de poursuivre les recherches sur les probiotiques, en médecine vétérinaire.

Cette expérimentation animale permettra d'évaluer l'impact de l'ajout d'une formulation probiotique chez des chiens nourris avec un aliment du commerce de basse qualité sur la qualité des fèces (appréciée par les modifications de consistance et de la flore intestinale et la digestibilité), le poids et

les paramètres hématologiques et biochimiques (sur un échantillon de sang prélevé à la veine antébrachiale, soit 3 prélèvements de 5 ml par animal au cours de toute la période expérimentale).

Pour ce faire nous allons travailler sur 2 groupes de 7 chiens de l'animalerie (1 groupe témoin, 1 groupe traité recevant la formulation probiotique). Après une période d'acclimatation de 2 semaines à l'aliment commercial, il sera ajouté cette ration la formulation de probiotique pour le groupe traité pendant 30 jours.

L'incidence de cet ajout sur le poids des chiens, la digestibilité, la consistance des fèces et leur composition bactérienne sera évaluée. Les fèces sont collectées à même le sol. Trois prises de sang de 5 ml par animal seront réalisées au cours de chacune des phases de l'étude (7 jours avant le traitement, 28ème jour de traitement et 12 jours après la fin du traitement) pour contrôler l'évolution des paramètres biochimiques et hématologiques.

L'ensemble de ce projet a été construit avec la volonté de mettre en place et de respecter « la règle des 3 R ». Seules les expériences absolument indispensables au succès du projet seront mises en œuvre. Les probiotiques ont été sélectionnés *in vitro* initialement. Ce type d'étude ne peut être réalisée que sur des animaux vivants, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer les conséquences de la supplémentation en probiotique dans la ration (principe de remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet et le traitement statistique des résultats (principe de réduction). Les conditions d'expérimentation (prise en compte des points limites appropriés) et d'hébergement sont optimisées afin de s'assurer du bien-être des animaux, de réduire la douleur et/ou l'anxiété et garantir la qualité des résultats tout au long des procédures expérimentales. Les locaux d'hébergement climatisés toute l'année sont les mêmes que ceux de l'expérimentation. En dehors de l'étude, les chiens sont logés par 2 sur 8 m² (la séparation grillagée entre les 2 boxes de 4 m² est maintenue ouverte, elle n'est fermée que le temps du repas pour éviter de potentiel conflit). Au cours de l'étude, les chiens ne seront maintenus en box individuel (4 m²) que 2 ou 3 jours par semaine pour la collecte au sol de leurs selles propres. Chaque chien est surveillé quotidiennement par les soigneurs. Le sol de chaque box individuel de 4 m² est recouvert de copeaux et nettoyé quotidiennement. Il dispose également d'un caillebotis surélevé sur lequel il peut se coucher, ainsi que de jouets (balles, kongs ...) et d'un distributeur automatique d'eau. La radio, jouant musique et voix, est laissée toute la journée (de 7h à 17h). Les boxes sont séparés par une porte grillagée permettant aux chiens de se voir lorsque cette dernière est fermée. En dehors des 2 (ou 4 jours, 1 fois) de récolte des selles et de la distribution des repas, la porte est ouverte entre 2 boxes. Chaque chien s'exerce chaque jour sur une surface de 16 m² avec un congénère pendant le nettoyage de son box (principe de raffinement).

16152 La fibrillation auriculaire (FA) est le trouble du rythme cardiaque le plus fréquent (1% de la population générale). En cas d'échec des traitements médicamenteux, un traitement physique par radiofréquence (ablation) qui vise à détruire les tissus à l'intérieur du cœur responsable des troubles du rythme cardiaque est proposé. Des cathéters sont introduits dans les cavités cardiaques (les oreillettes) où un courant de radiofréquence (RF) est délivré afin de chauffer le tissu cardiaque à plus de 60°C, ce qui a pour effet de détruire ses capacités de conduction électrique. On observe cependant dans 20% des cas environ une récurrence de l'arythmie à distance, due à une « reconnexion » électrique dont le mécanisme reste mal élucidé. On ne sait pas notamment si la reconnexion est due à une lésion insuffisante ou à une re-colonisation de la cicatrice par des cellules électriquement actives.

L'objectif de notre étude est d'analyser par une technique inédite (la transparence histologique) le volume lésionnel induit par radiofréquence en comparant deux types de lésions réalisées à différentes puissances. Nous étudierons le volume lésionnel en 3D et la présence de plages de cellules viables au sein de celui-ci. Nous étudierons également les impacts lésionnels sur les tissus adjacents (poumons, aorte, péricarde), autre donnée peu connue de la physiopathologie des lésions de RF. In fine, une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait améliorer le taux d'efficacité à long terme du traitement interventionnel de la FA.

Dans le cadre de cette étude nommée AWLEV (étude 1), 25 porcelets Large-White seront inclus. Un animal sera utilisé dans le but de valider les techniques d'ablation, de prélèvement et d'analyse

histologique. Vingt-quatre animaux (2 groupes de 12, 2 puissances de radiofréquence) seront utilisés pour l'ensemble de l'étude.

Le modèle porcin a été choisi car il présente une anatomie cardiaque assez volumineuse (critère nécessaire à l'étude histologique fine) et comparable à celle de l'Homme, et permettra de réaliser les interventions dans les mêmes conditions que chez l'humain.

Tout sera mis en œuvre pour respecter la règle des 3R :

REPLACER : l'étude AWLEV est une étude qui a pour objectif de démontrer la précision et les conséquences d'une technique interventionnelle. Il n'existe pas de méthode alternative permettant d'atteindre cet objectif dans des conditions les plus proches possibles des cas cliniques.

REDUIRE : le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum, défini sur les données d'une étude précédente, ainsi que sur une évaluation statistique permettant de calculer le nombre nécessaire pour obtenir une différence significative entre plusieurs groupes. En plus de l'étude principale sus-citée, deux autres études seront menées sur les mêmes animaux, afin d'étudier deux effets encore méconnus de la ventilation mécanique sur la dysfonction diaphragmatique. Lorsqu'un patient est intubé et ventilé, il existe une perte de force diaphragmatique au fil du temps rendant plus difficile le sevrage du respirateur. C'est un phénomène connu de réanimation, entraînant un surcoût et une morbi-mortalité majeures. Les mécanismes à l'origine de cette dysfonction sont mal connus et peu étudiés.

La première étude « ajoutée » (ETIC-VIDD, nommée étude 2) s'intéresse à l'influence des volumes d'insufflation sur la dysfonction diaphragmatique acquise sous ventilation mécanique. L'hypothèse de l'étude est qu'une réduction des volumes d'insufflation permettrait de diminuer l'incidence et la sévérité de la dysfonction diaphragmatique acquise sous ventilation mécanique. Si cette hypothèse s'avère exacte, elle pourrait permettre de changer les stratégies de ventilation mécanique appliquées dans les services de soins critiques.

La deuxième étude « ajoutée » (DiAsyncro, nommée étude 3) s'intéresse à l'influence de l'asynchronie respiratoire (mauvaise synchronisation entre le respirateur et le patient) sur la dysfonction diaphragmatique. En effet, on peut observer chez certains patients, particulièrement avant leur admission à l'hôpital, une inadaptation entre le respirateur et le patient. L'hypothèse de cette étude est qu'une asynchronie, même de courte durée, est délétère pour le patient. Si cette hypothèse s'avère exacte, elle pourrait mener à une amélioration de la prise en charge pré-hospitalière des patients nécessitant une ventilation mécanique. Pour chacune de ces 2 études, 12 cochons du projet AWLEV seront utilisés avant sacrifice.

RAFFINER : la souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée des 3 protocoles, avec un protocole d'approfondissement de l'anesthésie et d'intensification de l'analgésie. Pour les phases de réveil et post-opératoires, une analgésie locale et systémique de longue durée sera prévue, associée à un milieu enrichi (hébergement en groupe, litière, mise à disposition de jouets). Les animaux seront surveillés quotidiennement par le personnel permanent de l'animalerie expérimentale. Une grille de scoring pour l'observation du comportement des animaux sera mise en place, prenant notamment en compte le comportement général de l'animal (réactivité à l'intervenant, à ses congénères, comportement sociaux dans le groupe, positions...) et l'utilisation de la « piglet grimace scale » pour la manifestation de la douleur. L'euthanasie sera réalisée sous anesthésie générale. Le personnel impliqué dans le projet possède toutes les compétences nécessaires, d'un point de vue technique et réglementaire.

16153 Le mélanome est une tumeur maligne qui se développe à partir des cellules de la peau. C'est la forme la plus agressive des cancers cutanés chez l'homme. Son incidence s'accroît régulièrement. Récemment de nouvelles thérapies ont montré des résultats prometteurs chez certains patients atteints de mélanome, mais sans amélioration significative de leur pronostic vital. La présence de cellules immunitaires dans les tumeurs semble être le seul caractère associé au pronostic clinique mais ce critère n'est pas suffisant pour enclencher la régression tumorale. Les phénomènes de régression partielle sont fréquents chez l'Homme mais la régression tumorale spontanée totale reste rare. Nous proposons d'utiliser un modèle de mélanome cutané qui régresse chez le porc pour étudier ce phénomène de régression. Les porcs développent spontanément des mélanomes cutanés et une

régression tumorale spontanée et totale se met en place au bout de quelques semaines. Malgré de grandes similarités cliniques et microscopiques entre les tumeurs porcines et humaines qui justifient l'utilisation de ce modèle expérimental *in vivo*, aucune des mutations les plus fréquemment identifiées chez l'Homme n'a été retrouvée. Cependant, dans le modèle que nous nous proposons d'étudier, le mélanome régresse spontanément ce qui en fait un sujet d'étude pertinent pour la mise au point d'outils pronostiques ou thérapeutiques. Nos résultats indiquent que la régression du mélanome est d'origine multiple. Dans ce projet, nous cherchons à déterminer si cette régression est spécifique des cellules tumorales de ce modèle ou si elle pourrait être efficace contre des cellules tumorales portant la mutation NRAS(Q61K), fréquente chez l'Homme. Au cours de ce projet, les cellules tumorales d'un porcelet seront modifiées génétiquement avec la mutation activatrice Q61K du gène NRAS et ensuite réinjectées sur le même animal afin d'éviter un rejet de greffe et nous suivrons l'évolution de la greffe en tumeur, puis son éventuelle régression (hypothèse). Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est de 33 animaux, dont 3 animaux utilisés pour la mise au point du nombre de cellules à greffer et 3 lots de 10 animaux, un avec les cellules dissociées non modifiées, un avec les cellules modifiées avec le rapporteur fluorescent et un dernier avec les cellules modifiées fluorescentes plus la modification sur le gène NRAS. Des analyses *ex vivo* et *in vitro* seront produites sur les tissus prélevés en fin de procédure pour envisager le remplacement futur de l'animal entier. Les protocoles intègrent en premier lieu la nécessité d'éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Les interventions seront exécutées sous anesthésie générale. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé et un traitement antalgique sera mis en œuvre si besoin. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet et en cas d'apparitions d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement comme dans la saisine 14-47 : animaux en loge collective pour la reproduction, enrichissement avec jouet (ballon, chaîne, « mordillo ») et distribution d'épluchure de légumes et fruit.

16154 Les plaquettes sanguines jouent un rôle clé dans l'hémostase, c'est-à-dire l'arrêt du saignement. Suite à une lésion vasculaire elles adhèrent à la paroi lésée, s'activent et s'agrègent pour former un clou hémostatique qui stoppe les saignements. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus ont été clairement identifiés.

Il a été proposé dans d'anciennes études que les plaquettes participeraient également au maintien de l'intégrité vasculaire, c'est-à-dire le maintien d'un endothélium vasculaire normal. En effet, une thrombopénie entraînerait un affinement et une fenestration, c'est-à-dire une ouverture, de l'endothélium. Cependant, ces observations n'ont jamais été confirmées.

L'objectif de cette étude est d'évaluer et de caractériser le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire. Comprendre ce rôle présente des perspectives applicables à la transfusion sanguine.

Afin d'évaluer et de caractériser le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire, des animaux seront traités afin de réduire leur compte plaquettaire. L'injection d'un colorant bleu sera réalisée pour voir si une fuite vasculaire est observable, traduisant une perte de l'intégrité vasculaire. Nous observerons également l'aspect de l'endothélium de leurs vaisseaux sanguins.

Remplacement : Le but étant d'évaluer la perte de l'intégrité vasculaire en condition de thrombopénie et d'observer l'aspect de l'endothélium des vaisseaux, un modèle *in vitro* ne peut être envisagé. Ce type de modèle nécessite des modèles assez sophistiqués pour appréhender toute la complexité générée par les phénomènes d'affinement et de fenestration de l'endothélium.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 10 souris par groupe pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Les groupes seront comparés par un test ANOVA suivis d'un post test de Dunn.

Raffinement : Le stress et la douleur des animaux utilisés dans ce projet seront réduits au maximum :

- 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, Ocrygelâ, à la surface des yeux pendant l'anesthésie.
- Anesthésie de l'animal pour toute procédure susceptible d'induire une douleur.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné. Une grille de points limites a été établie pour la procédure expérimentale afin de soustraire l'animal aux procédures si nécessaire afin de limiter la souffrance.

Cette étude nécessitera au maximum l'utilisation de 200 souris.

16155 Le corticosurréalome (ACC) est un cancer rare mais au pronostic sombre de par son diagnostic tardif engendrant souvent des métastases qui sont la principale cause de mortalité des patients cancéreux, représentant 90% de tous les décès par cancer.

L'expression élevée de la fascine corrèle pour plusieurs types de tumeurs à l'état métastatique avec un phénotype agressif et une survie réduite des patients. Cette protéine de stabilisation des microfilaments d'actine est donc impliquée dans la migration des cellules tumorales et représente une excellente cible thérapeutique.

Nous avons récemment montré *in vitro* que la fascine est un facteur essentiel dans le processus d'invasion des cellules ACC et qu'un inhibiteur chimique de la fascine est capable d'inhiber cette invasion.

Aujourd'hui nous avons pour objectif de mettre en évidence l'effet *in vivo* de l'inactivation de la fascine sur le développement métastatique mais aussi de tester l'efficacité d'un inhibiteur pharmacologique de la fascine via l'utilisation d'un modèle animal d'ACC métastatique déjà établi au laboratoire. Celui-ci consiste en l'utilisation de souris immunodéficientes (NMRI nudes) qui seront greffées en intrasplénique avec des cellules de corticosurréalome humains métastatiques capables de provoquer l'apparition de métastases hépatiques dans 90% des animaux.

Dans ce contexte pathologique, nous utiliserons la méthode des 3R (remplacer, réduire et raffiner) pour réduire à son minimum le nombre d'animaux tout en permettant de fournir des résultats statistiquement significatifs.

Ainsi, basé sur un calcul d'effectif, nous planifions d'utiliser 48 souris NMRI Nudes.

De plus, dans un souci de raffinement, le suivi du développement tumoral se fera par des mesures cinétiques utilisant un procédé non invasif : l'imagerie optique par bioluminescence. Toujours dans le souci du respect de la règle des 3R, l'ensemble des procédures de transplantation et d'imagerie seront réalisées sous anesthésie gazeuse associée, dans le cas de la chirurgie, à une analgésie péri-opératoire afin d'éviter toute douleur.

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 du bien-être. 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 coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 5 afin de respecter leur instinct grégaire.

Ces études seront essentielles pour prouver l'implication de la fascine dans le développement métastatique dans un modèle expérimental d'ACC et pour mettre en évidence l'efficacité thérapeutique d'une nouvelle molécule et ouvrir la route à de nouveaux traitements cliniques des corticosurréalomes.

16156 L'objectif de nos recherches est de comprendre comment le cervelet intègre et traite les informations qu'il reçoit de l'ensemble du corps afin de contrôler la coordination motrice. Nous enregistrerons *in vivo* les différents types cellulaires du cortex cérébelleux et procéderons à des stimulations et des perturbations des réseaux neuronaux pour déterminer les règles de traitement des informations. Nous utiliserons des outils activables par la lumière (techniques d'optogénétique) que nous ferons s'exprimer spécifiquement dans certains types cellulaires, ce qui permettra d'activer ou d'inhiber les réseaux neuronaux.

Les différents types de protéines photoactivables seront exprimés dans les neurones d'intérêt soit par transgénése, soit via une injection virale de pseudo adénovirus. Leur activation sera réalisée par le déclenchement d'une lumière bleue à travers une fibre optique positionnée à la surface du cerveau ou dans le tissu. L'étude du traitement de l'information dans les différents types cellulaires du cortex cérébelleux nous permettra de comprendre leur rôle dans la coordination motrice liée au cervelet.

L'utilisation de l'électrophysiologie *in vivo* sur la souris est nécessaire dans notre cas car l'étude doit s'effectuer sur un circuit intact pouvant impliquer des aires corticales situées à une grande distance (système impossible à reconstituer avec des techniques de remplacement de type culture cellulaire par exemple). Les tests comportementaux couplés à des stimulations (lumineuses dans notre cas), permettront de comprendre l'implication des cellules du cervelet lors de tâches nécessitant des traitements de haut niveau (apprentissage moteur, conditionnement, etc.). L'utilisation des souris transgéniques couplée à l'électrophysiologie *in vivo* et à des tests comportementaux permettra de développer des protocoles de stimulation dans le but de compenser des pathologies cérébelleuses de type ataxie, mouvements anormaux ou tremblements.

Le projet sera conduit en accord avec la règle des 3 "R".

REDUIRE: L'utilisation de l'optogénétique permet de réduire le nombre d'animaux utilisés, car l'expression spécifique des protéines photoactivable limite le risque d'erreur de ciblage des outils et permet d'éviter des approches lésionnelles ou douloureuses. Après vérification de l'inocuité des transgènes, les animaux deviennent leur propre contrôle, ce qui permet de limiter le nombre de groupes d'étude. Le nombre d'animaux par groupe expérimentaux a été calculé au minimum pour permettre une analyse statistique fiable des résultats.

RAFFINER : L'utilisation de l'optogénétique permet également de raffiner les protocoles de stimulation afin d'accumuler un grand nombre d'informations sur un minimum d'animaux. Les expériences prévues dans ce projet seront conduites sur des cohortes d'animaux maintenus en groupe dans leur cage. Les cages seront enrichies avec du matériel de nidification et des bâtons à ronger. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie adéquates et durant toute la durée des procédures, la température corporelle de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté. L'état de santé des animaux sera évalué durant la période post-opératoire et des points limites prédictifs permettant d'interrompre les procédures et ainsi de soustraire l'animal à la souffrance ont été établis.

REPLACER : Ces expériences ont pour but de comprendre comment le traitement de l'information dans les différentes zones du cervelet conduit à la régulation de la coordination motrice via la communication avec le cortex cérébral. Ainsi, le système biologique doit être intact pour pouvoir être étudié. L'utilisation de l'électrophysiologie *in vivo* sur la souris est nécessaire dans notre cas car l'étude doit s'effectuer sur un circuit intact pouvant impliquer des aires corticales situées à une grande distance (système impossible à reconstituer avec des techniques de remplacement de type culture cellulaire par exemple). Enfin, une partie des travaux sera réalisé *in silico*, en particulier pour la prédiction des paradigmes utilisés pour la stimulation et pour l'interprétation des règles de codage de l'information.

5 lignées d'animaux transgéniques seront utilisées en plus d'animaux sauvages afin de cibler les différents types cellulaires et activer les entrées du cortex cérébelleux. 2 sont déjà présentes au laboratoire et 3 sont en cours de création. Nous utiliserons au cours de ce projet qui durera 4 ans 2400 animaux au total.

16157 Le projet : Augmenter la dépense énergétique est une façon de lutter contre l'obésité, devenue un fléau mondial et associée à de nombreuses comorbidités. Une façon d'augmenter cette dépense est d'activer la thermogenèse du tissu adipeux, ce qui a pour conséquence de brûler les graisses au lieu de les stocker.

Une nouvelle voie de contrôle de la thermogenèse a été identifiée et validée *in vitro* à l'aide de molécules synthétiques, y compris dans des modèles cellulaires humains.

Il est à présent indispensable de tester la modulation de cette voie *in vivo*, à savoir sur animal entier, afin de confirmer son efficacité sur le métabolisme énergétique associée à la perte de masse grasse. Pour ce faire, ces molécules seront injectées à des souris afin de tester si elles sont capables d'augmenter leur dépense énergétique et donc de leur faire perdre du poids. L'utilisation parallèle d'un modèle de souris mutée pour la cible est indispensable pour prouver la spécificité d'action des molécules synthétiques testées.

Les animaux :

* Type : Souris immunocompétente C57BL/6J.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 72 souris expérimentales 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 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 nouvelles thérapies anti-obésité, pathologie prédisposant à de multiples comorbidités et 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 au modèle étudié.

16158 Le cancer des voies biliaires ou cholangiocarcinome (CC) est le 2^e cancer hépatique primaire le plus fréquent. A ce jour, son traitement reste inefficace en raison d'un taux élevé de récurrences post-résection et de sa résistance aux chimio-radiothérapies standard. L'inflammation chronique est un facteur de risque reconnu de développement des cancers. Des pathologies inflammatoires chroniques peuvent affecter l'arbre biliaire, principalement la cholangite sclérosante primitive (CSP) et la cholangite biliaire primitive (CBP). Dans cette ligne, la CSP constitue la première étiologie établie du CC dans les pays occidentaux. En revanche, la CBP ne semble jamais associée au CC. De cette observation, nous avons émis l'hypothèse que l'autoimmunité associée à la CBP alimenterait l'immunosurveillance du CC et protégerait les patients de son émergence. Pour évaluer cette question, 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. Cette étude ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'existe pas de modèles alternatifs pour étudier l'implication de la perte de tolérance périphérique et son effet sur la réponse immunitaire anti-cholangiocarcinome. Nous réaliserons des expériences de croissance tumorales combinées ou non avec la déplétion de certains lymphocytes, la neutralisation de certaines cytokines, ou bien avec l'utilisation en traitement prophylactique de certains peptides, ou adénovirus exprimant ces peptides, ayant une potentielle action anti-cholangiocarcinome. Dans ces modèles nous déterminerons la croissance tumorale de modèles de cholangiocarcinome, de carcinome hépatocellulaire, de cancer du poumon ou de fibrosarcome haplocompatibles (pour le fond génétique C56B/L6). Les cellules tumorales seront inoculées par voie sous-cutanée ou dans le foie. Les tumeurs de cholangiocarcinome, les foies, les ganglions lymphatiques et les rates seront également collectés, en fin de procédure, pour des analyses *ex vivo*. En utilisant ces approches, nous serons capables d'expliquer le lien entre autoimmunes délétères contre les cholangiocytes normaux et l'immunosurveillance contre le cholangiocarcinome. Ce projet doit notamment aboutir à l'identification de potentielle cible thérapeutique pour le traitement du cholangiocarcinome chez l'homme. Pour se faire, nous projetons d'utiliser des souris immunocompétentes (maximum n=1524). Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir : Remplacer : Autant que possible des validations *in vitro* et des prédictions *in silico* seront faites, notamment pour la sélection des peptides utilisés en vaccination. Cependant les

modèles *in vitro* ne permettent pas d'observer entièrement la réponse immunitaire d'un organisme, notamment les mécanismes de tolérance ou de perte de tolérance. En effet, la réponse anti-tumorale et auto-immune font intervenir de nombreux types cellulaires dans des environnements complexes impossible à reproduire *in vitro*. Ils ne sont également pas des preuves suffisantes pour envisager de futurs essais chez l'Homme. Réduire : Les modèles ayant déjà été validés par publications et étant maîtrisés au sein du laboratoire, cela permet d'éviter des étapes d'optimisation. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera stoppée si les manipulations initiales invalident l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés, soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) et partagées avec nos collaborateurs, afin d'en extraire le maximum de données tout en réduisant le nombre de souris utilisées pour conclure. Raffiner : L'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter la souffrance des animaux (anesthésie...). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les souris seront élevées en communauté, disposent de nourriture et d'eau ad libitum ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et tunnel en carton). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'anesthésie et 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.

16159 Il existe plusieurs types de tumeurs malignes de l'œil, celle qui est le plus fréquemment rencontrée est le mélanome choroïdien. Cette tumeur se développe sous la rétine dans un tissu appelé choroïde. L'incidence de ce cancer est de 1-2 cas pour 100 000 habitants soit environ 1000 nouveaux cas par an en France. Le principal traitement de cette tumeur maligne intraoculaire est la radiothérapie (utilisation de rayonnements détruisant la tumeur) externe par faisceau de protons (protonthérapie) ou par disque d'iode radioactif placé sur l'œil en regard de la tumeur (curiethérapie). Cette technique permet une rémission de la tumeur oculaire à long terme si la tumeur n'est pas trop épaisse et qu'elle se limite à l'œil ; elle présente le grand avantage de conserver le globe oculaire contrairement au traitement alternatif dans lequel l'œil atteint est enlevé (énucléation). L'amélioration du traitement par radiothérapie est donc un enjeu majeur pour les patients. Cependant, 50 à 60% des yeux traités par radiothérapie oculaire développent une maladie de la rétine appelée rétinopathie radique (liée aux rayonnements) dans les années suivant le traitement. Cette rétinopathie résulte de dommages créés par la radiothérapie sur les vaisseaux rétinien. Ces vaisseaux sont endommagés de façon irréversible, et ne permettent plus une oxygénation correcte de la rétine. Par conséquent, l'œil irradié devient malvoyant. Les principaux traitements utilisés à ce jour pour limiter les effets secondaires de la radiothérapie (utilisation du laser, injections intraoculaires, etc) ont une faible efficacité, et ne permettent pas de réparer les vaisseaux endommagés par l'irradiation ni d'améliorer l'oxygénation de la rétine irradiée.

L'enjeu du projet est de comprendre comment s'installent les complications vasculaires dans la rétine saine qui surviennent après la radiothérapie, afin de mieux les cibler avec un traitement adapté, et éviter d'en arriver à devoir enlever l'œil.

Certains mécanismes des rayonnements menant aux complications vasculaires sont connus (dégradation directe ou indirecte de l'ADN, pertes des cellules endothéliales (qui tapissent les capillaires rétinien et évitent les caillots) mais ils ne peuvent pas expliquer toutes les modifications observées.

Nous voulons tester ici une hypothèse prometteuse : l'inactivation d'une succession de signaux cellulaires au niveau des vaisseaux rétinien, déclenchée par les radiations ionisantes et qui serait en partie responsable des complications de la rétinopathie radique. Le médicament que nous souhaitons tester, le Fasudil, est déjà connu pour ses effets protecteurs sur les vaisseaux dans plusieurs maladies vasculaires et cardiaques. A ce stade, une phase de recherche préclinique (chez l'animal) est indispensable pour tester ce traitement par voie intraoculaire (les traitements par prise orale ou intraveineuse n'ont qu'une très faible diffusion dans l'œil).

Les expériences qui pouvaient être faites sur des lignées cellulaires *in vitro* ont déjà été réalisées et il est maintenant nécessaire de passer au vivant pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

Les objectifs de l'étude sont :

- Comprendre les effets secondaires à une irradiation oculaire thérapeutique dans un modèle animal de rétinopathie radique chez le rat.
- Étudier, dans le même modèle, l'effet de l'administration intraoculaire d'un nouveau traitement sur la rétinopathie radique.

L'espèce utilisée est le rat, de souche Long Evans (dont la pigmentation permet une bonne visualisation du fond d'œil en imagerie oculaire) sur une durée d'expérimentation de 1 an.

Conformité à la règle des 3R :

Remplacer : Des études *in vitro* ont déjà été réalisées sur des lignées cellulaires irradiées mais ne permettent pas la compréhension des mécanismes retardés liés à l'irradiation.

Réduire : Le nombre total d'animaux nécessaires est de 157 animaux. Le nombre d'animaux a été réduit en combinant le maximum d'analyses biologiques sur les mêmes échantillons de rétine. Les analyses statistiques pour les différents marqueurs étudiés nécessitent un nombre d'échantillons minimal de 5 demi-rétines pour avoir des données significatives. La phase exploratoire permettra de sélectionner les marquages et analyses les plus pertinentes pour diminuer au maximum le nombre d'animaux.

Raffiner : Tous les examens et interventions sur les animaux se feront sous anesthésie générale et locale limitant ainsi tout stress ou douleur causés aux animaux. De plus, les interventions réalisées sont pratiquées chez l'homme soit sous anesthésie locale (Injection intraoculaire) soit sans anesthésie (radiothérapie, imagerie oculaire) et sans douleur majeure. Les animaux sont hébergés en conditions enrichies (jeux) avec respect du rythme circadien sous surveillance quotidienne. Pour éviter une cécité chez les rats, seul un œil par rat recevra les rayons ionisants.

En conclusion cette étape expérimentale est indispensable pour avancer dans la compréhension de la rétinopathie radique et le développement d'un médicament à utiliser en prévention de cette maladie..

16160 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe notamment des actifs ayant un intérêt thérapeutique dans le domaine de l'inflammation chronique de l'intestin. Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets d'un traitement chronique par 8 composés (la dénomination des composés est sujette à confidentialité) sur l'inflammation colique chez la souris. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de détailler l'efficacité et les mécanismes d'action de leurs composés.

Le modèle d'inflammation colique qui sera utilisé est un modèle d'inflammation induite par adjonction de DSS dans l'eau de boisson pendant 5 jours. Les composés à tester seront administrés pendant 10 jours à partir du début de l'administration du DSS. Le poids corporel, la prise alimentaire et la prise de boisson des animaux seront mesurés tous les jours pendant toute la phase de traitement. Le jour de la dernière administration du composé, un prélèvement de fèces sera réalisé (pour analyse de biomarqueurs) puis les animaux seront euthanasiés et le côlon sera ainsi prélevé, mesuré et pesés. Une analyse histologique macroscopique sera réalisée sur une portion du côlon par deux expérimentateurs afin de quantifier les zones d'épaississement, d'hyperhémie et d'ulcération de la muqueuse. Une seconde portion de côlon sera prélevée et immédiatement congelée pour une analyse d'expression de biomarqueurs d'intérêt. Une troisième et dernière portion sera réservée pour une éventuelle analyse histologique sur coupes pour l'établissement d'un score de sévérité sur des critères microscopiques.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal utilisé est un modèle d'inflammation colique induite par administration de DSS chez la souris qui est un modèle particulièrement bien caractérisé dans la littérature (Chassaing et al, 2014, Dextran-Sulfate Sodium (DSS)-induced colitis in Mice,

Curr Protoc Immunol, 104 : Unit15.25). Le protocole sera planifié de façon à limiter au maximum tout stress induit aux animaux (périodes d'acclimatation et d'habituation des animaux aux procédures

d'administration) et à établir des points limites appropriés. Les animaux seront hébergés collectivement (4 animaux par cage) et un enrichissement de leur environnement sera mis en place sous forme de brique de bois spéciales pour rongeurs et de dômes en cartons.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de résultats préliminaires obtenus lors d'études antérieures menées par le client. Le nombre de 12 animaux par groupe a été défini comme le nombre minimum d'animaux à utiliser pour pouvoir mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés. Un total de 120 souris Balb/cJ sera utilisé, divisé en 10 groupes de 12 animaux : un groupe contrôle du modèle (non traité au DSS), un groupe contrôle du traitement (traité au véhicule) et 8 groupes traités respectivement avec chacun des 8 composés à tester.

- 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 l'inflammation colique.

16161 Le microbiote intestinal (ou flore intestinale) joue un rôle majeur dans l'activation du système immunitaire, notamment à l'encontre des tumeurs. Il a été montré qu'un régime alimentaire riche en fibres permet de modifier la composition de la flore intestinale, et active l'immunité au niveau intestinal. Ainsi, lorsque l'on implante une tumeur sous cutanée (mélanome) à des souris sous régime riche en fibres, la croissance tumorale est très fortement ralentie. Ceci est dû à une réponse immunitaire boostée, provenant a priori de l'intestin. Un régime riche en fibre permet donc une immunosurveillance accrue des cancers. Afin de pleinement démontrer le rôle de la nutrition dans la prévention des cancers, nous proposons ici d'évaluer les capacités préventives des cancers d'un régime riche en fibres, dans un modèle de cancer chimio-induit, qui se développe « naturellement » sur 250 jours suite à une exposition à un agent carcinogène. En comparant les flores des souris répondeuses et non répondeuses, nous identifierons les espèces bactériennes présentes uniquement dans la flore des souris répondeuses. Cette démonstration au plus proche de la situation clinique des patients renforcera nos observations et sera rapidement transférable en clinique humaine, ainsi que dans la population générale.

Ce projet nécessite au total 192 souris C57Bl/6 toutes soumises à l'agent carcinogène et dont la moitié sera sous régime riche en fibre. 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 intestinale 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, car seul 20% des souris exposées développeront une tumeur. Le pourcentage d'animaux développant une tumeur peut paraître faible mais il est au plus proche de la situation chez l'Homme suite à une exposition à un carcinogène. Enfin, en termes de Raffinement, les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie. Le régime alimentaire n'est associé à aucune contrainte. L'injection sous-cutanée de l'agent carcinogène n'induit qu'une légère souffrance des animaux. La croissance tumorale sera limitée à un seuil de douleur modéré, assuré par un suivi quotidien du bien-être des animaux.

16162 Le cancer du sein est le premier cancer féminin en termes de fréquence et la première cause de décès par cancer chez les femmes, avec plus de 600 000 décès estimés en 2018 dans le monde. Sans amélioration dans la prise en charge du cancer du sein, le taux de mortalité lié à cette pathologie aura augmenté de 58% en 2040, pouvant atteindre environ 1 million de décès.

La considération du microenvironnement immunitaire dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est une option prometteuse. Au cours des dernières années, certaines thérapies ciblant le système immunitaire ont déjà démontré des efficacités thérapeutiques sans précédent dans certains types de cancer (mélanome, cancer du poumon). Cependant, à l'heure actuelle, seulement un faible nombre de patients répondent à ces immunothérapies innovantes. Ainsi, l'identification de nouvelles

cibles thérapeutiques dans le microenvironnement immunitaire des patientes atteintes de cancer du sein reste primordiale.

A l'heure actuelle, le rôle des interférons de type I (IFN-I) dans l'immunité antitumorale n'est plus à démontrer, et fait partie des nouvelles immunothérapies prometteuses dans le traitement du cancer. Cependant le taux de réponse aux immunothérapies chez les patients reste faible malgré d'excellents résultats chez les patients répondeurs. De plus, le traitement des patients avec des IFN-I peut amener à des effets secondaires de toxicité. C'est pourquoi le rôle des interférons type III (IFN-III) est aujourd'hui fortement suggéré.

Des premiers tests *in vitro* indiquent que les IFN-III impactent le système immunitaire, et donc la réponse anti-tumorale. Cependant, seules des études *in vivo* avec des modèles murins peuvent permettre d'étudier l'effet des IFN-III sur l'évolution des tumeurs.

Pour chacune des procédures expérimentales, le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par des personnels compétents permet de limiter au maximum toute souffrance animale.

Ce projet utilisera au maximum 500 souris

16163 Chaque année, environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués à travers le monde, responsables de plus de 8 millions de décès. Les traitements contre les cancers ont profondément évolué ces dernières années et l'immuno-oncologie représente aujourd'hui une approche thérapeutique prometteuse dans ce domaine. C'est dans ce contexte que notre laboratoire a fait le choix de développer un anticorps thérapeutique dirigé contre un antigène tumoral particulièrement surexprimée dans le cancer de la vessie et dans le cancer du sein. Différents formats de cet anticorps pourront être envisagés afin de sélectionner celui qui aura à la fois la meilleure efficacité anti-tumorale et le meilleur profil de sécurité chez le patient. Ces anticorps auront comme fonctionnalités majeures d'induire une cytotoxicité spécifique contre la cellule tumorale soit par ADCC via l'engagement des récepteurs Fc dans le cas d'anticorps monoclonaux, associé à un recrutement spécifique des cellules NK dans le cas d'anticorps bispécifiques (NKCE, NK Cell Engager), ou soit par libération d'un agent cytotoxique lié à l'anticorps dans le cas d'anticorps couplés à une drogue cytotoxique (ADC, Antibody Drug Conjugate). Le présent projet consistera à évaluer l'efficacité cytotoxique spécifique de cet anticorps sur des cellules tumorales *in vivo*.

Le projet s'articulera en plusieurs étapes :

- une première étape permettra d'évaluer les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie de ces anticorps dans le sang périphérique des animaux. Le but est d'optimiser les fréquences et doses d'administration de ces molécules pour l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale.
- dans un second temps, des tests fonctionnels de nos anticorps (ADCC ou NKCE) pourront être réalisés *in vitro* avec des cellules immunitaires provenant des souris de notre modèle d'intérêt.
- dans un troisième temps, l'efficacité anti-tumorale de nos anticorps sera évaluée sur des souris porteuses de tumeurs. Différents modèles seront utilisés avec la greffe des cellules tumorales soit en sous-cutanée (SC), soit en orthotopique, soit en intraveineuse (IV). Ces tests *in vivo* permettront d'établir un classement de nos anticorps afin de déterminer notre candidat médicament.

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

- réduire : le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux et mode d'action de nos anticorps 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. Cette comparaison permettra ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

- remplacer : 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 de ciblage spécifique de cellules tumorales, impossible à mimer *in vitro*.

-raffiner : Afin de limiter le stress, 2 à 5 animaux sont hébergés 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.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet sera de 11500 souris maximum sur 5 ans.

16164 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), qui comprennent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont en constante augmentation dans les pays développés et en forte incidence dans les pays émergents. Ces maladies se caractérisent par une inflammation chronique de la paroi du tube digestif liée à une hyperactivité du système immunitaire digestif. Elles sont le plus souvent diagnostiquées chez des jeunes sujets de 20 à 30 ans et ont un réel impact négatif sur la qualité de vie des patients. La maladie fonctionne souvent par la succession de poussées inflammatoires et de périodes de rémission plus ou moins longues. Les causes de ces pathologies récentes ne sont pas connues. Des causes environnementales liées au mode de vie occidental (nourriture, pollution, pesticides) associées à une susceptibilité génétique des patients sont suspectées. Il n'existe aucun traitement curatif et l'arsenal thérapeutique actuel n'agit que de façon suspensive. Les traitements actuels ciblent essentiellement les dérèglements du système immunitaire sans action sur l'initiation du dysfonctionnement. Le but de ce projet est de tester de nouvelles approches thérapeutiques en ciblant des acteurs précoces responsables de l'initiation de l'inflammation. L'identification d'un de ces acteurs a permis de développer des anticorps spécifiques susceptibles de bloquer les phases d'initiation de l'inflammation. Nous nous proposons de tester l'efficacité antiinflammatoire et régénérative (en vue d'une reconstitution complète du tissu lésé) de ces anticorps sur un modèle de souris reproduisant les symptômes des MICI. Dans l'expérimentation proposée, les souris seront âgées de 6-7 semaines provenant d'un fournisseur agréé. 360 souris seront nécessaires pour ce projet prévu pour une durée de 60 mois. Après une semaine d'adaptation, le traitement par un inducteur d'inflammation colique (DSS) dans l'eau de boisson sera prolongé pendant une semaine et/ou poursuivi par deux semaines de récupération (sans inducteur) selon les protocoles publiés et couramment utilisés. Les procédures consisteront à traiter les souris par les différents anticorps à disposition (4 anticorps validés quant à leur efficacité *in vitro*) soit pendant les 7 jours de traitement par l'inducteur soit après une et deux semaines de récupération sur différents groupes de souris. Les souris de l'ensemble des groupes concernés seront euthanasiées soit à Jour 7 pour l'évaluation de l'inflammation, soit à Jour 14 et Jour 21 pour les groupes de récupération. 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 par les différents anticorps et de sélectionner le meilleur anticorps pour une application future chez l'homme. Notre approche expérimentale est en adéquation avec la règle des 3R Remplacer : il est impossible d'évaluer l'effet thérapeutique d'anticorps sur un modèle *in vitro* ou *in silico*. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire la complexité d'une colite, et seul le modèle animal permet de conduire ce projet. La souris est le plus petit animal adapté à ce travail avec une littérature validant ce choix Réduire : L'effectif proposé tient compte de la mortalité possible liée à l'induction de la colite et du fait qu'un effectif plus faible ne permettrait pas de démontrer une différence statistique significative. Raffiner : Les souris seront surveillées quotidiennement. 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). Les effets du traitement seront contrôlés par des pesées et une surveillance selon un score standardisé de colite clinique. Ce score correspond à une grille d'évaluation clinique permettant de prendre des mesures 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). 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).

16165 Mots clés : cancer, immunothérapie, immuno-oncologie

Type de recherche : recherche appliquée

But 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 pour l'efficacité des anticorps thérapeutiques. Ce projet vise à étudier chez la souris le comportement d'un système immunitaire humain reconstitué envers des tumeurs humaines, en fonction de différents traitements aux anticorps thérapeutiques. Les souris immunodéficientes seront utilisées, elles n'ont pas de système immunitaire et toléreront ainsi la greffe de cellules humaines. L'injection des cellules humaines (les cellules souches hématopoïétiques), cellule mère de toutes les cellules sanguines, injectées permettront d'« humaniser » le système hématopoïétique des souris (les souris auront donc des cellules sanguines humaines). Lorsque que le système immunitaire humain sera bien mis en place dans les souris, différents modèles tumoraux seront implantés et les traitements antitumoraux seront validés.

Ce projet nécessitera sur 3 ans un maximum de 912 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 : les procédures seront faites sur le nombre minimal de souris nécessaires permettant de conclure de façon fiable statistiquement ; Les expériences sur les différents modèles seront réalisées en séquentiel, les résultats seront évalués pour déterminer la nécessité de poursuivre les expériences, afin de réduire autant que possible le nombre de souris utilisées ;

Raffinement : Avant la mise en place du protocole les souris seront acclimatées aux expérimentateurs du projet afin de limiter leur stress. Toutes les précautions seront prises pour détecter et minimiser la souffrance, la douleur et le stress des animaux (observation quotidienne, pesée des animaux, traitement antalgique si besoin). Les signes cliniques propres à ces modèles ont été définis.

16166 Grâce à la collecte automatique et en continue de données individuelles de comportement alimentaire via des distributeurs automatiques, de nouveaux modèles d'alimentation de précision (alimentation adaptée à chaque individu) des truies en gestation ont été développés. Ces systèmes permettent d'envisager, en plus de la mesure du comportement alimentaire, l'intégration de paramètres comportementaux (activité physique, interactions sociales, occupation de l'espace, nombre de visites à l'abreuvoir...) et environnementaux (température, humidité...) qui influencent fortement les besoins nutritionnels. Cela permettrait d'améliorer les systèmes d'alimentation de précision. Plusieurs mesures sont envisagées : la température et humidité de la salle, l'activité physique de chaque animal via des accéléromètres fixés sur l'oreille qui enregistrent le temps passé couché, debout et en mouvement de chaque animal ; le comportement de l'animal (interactions sociales, occupation de l'espace) grâce au suivi par vidéo, le nombre de visites et temps passé au distributeur d'aliment et au distributeur d'eau, l'analyse des émissions sonores qui renseigne sur les interactions sociales ou la santé si l'animal tousse. Ces données comportementales ont donc un lien direct avec l'état de bien-être des animaux.

L'objectif de ce projet est d'améliorer nos modèles d'alimentation de précision en collectant en continu des données de comportement et de production sur des groupes de truies gestantes afin de développer, dans un futur projet, un dispositif d'élevage innovant mettant en place en temps réel des alertes en cas de situation critique en terme de santé ou bien-être, et des actions correctrices sur le milieu d'élevage ou l'alimentation. Pour cela, ce projet permettra de définir, à partir de situations diversifiées, dégradées ou non, en terme de bien-être, des combinaisons de mesures qui sont indicatrices de l'état de bien-être d'un animal, ainsi que leurs valeurs seuils à partir desquelles on pourra objectivement dire que le bien-être est dégradé (ex. valeur d'activité journalière trop importante, utilisation exacerbée de l'abreuvoir). Ainsi, nous étudierons l'effet d'un stress thermique (hors de la zone de confort des truies), d'un stress de compétition alimentaire (diminution du temps d'accès aux

alimentateurs), d'un stress social (formation du groupe de truies en début de gestation), d'un stress environnemental (bruits soudains), et d'un enrichissement du milieu (ajout de paille supérieur à l'habitude). Les données seront collectées au cours d'expériences de mise en situation de bien-être dégradé sur 5 groupes de truies gestantes (18 à 20 truies par groupe) recevant une alimentation de précision, pendant lesquelles les comportements alimentaires, l'état corporel et les performances de reproduction des truies seront enregistrés. Un maximum de 100 truies sera soumis aux expérimentations.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement: les mesures sur les animaux sont requises car il n'est pas possible à ce jour de modéliser le stress d'une truie, ni les interactions au sein d'un groupe. Ces travaux ne peuvent se faire autrement que sur un animal entier et vivant. Les données générées dans ce travail seront ensuite utilisées pour améliorer l'outil d'alimentation actuel. Raffinement: cette expérimentation est réalisée dans une salle avec des équipements (station d'alimentation automatique, capteurs d'activité et de température) permettant de mesurer les performances individuelles d'animaux élevés en conditions proches de celles rencontrées pratiquement en élevage (logement en groupe des truies gestantes). De plus, tout au long du projet, les animaux seront suivis quotidiennement par les personnes en charge de l'expérience ou les animaliers formés pour l'expérimentation animale. Tout animal souffrant sera soigné en fonction de son état, selon les recommandations vétérinaires. Réduction: le nombre d'animaux (100 truies) et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs et permettront d'atteindre le niveau de précision souhaité pour évaluer avec précision les effets des différentes situations de stress malgré la forte variabilité interindividuelle généralement observée dans ce type d'étude.

16167 En chirurgie humaine (orthopédique ou dentaire), lorsqu'une intervention nécessite le comblement d'un déficit osseux, l'utilisation d'un biomatériau permet de simplifier les procédures en évitant aux patients une étape de prélèvement d'os au niveau d'un second site, sain. La recherche autour des matériaux à finalité médicale permet l'émergence de produits de plus en plus efficaces. L'utilisation de biomatériaux pour favoriser la cicatrisation des tissus nécessite une connaissance approfondie du comportement de ces derniers dans l'organisme receveur. Aussi leur implantation *in vivo* est un prérequis indispensable à leur utilisation clinique. Cette implantation permet de prendre en considération l'intégralité des réactions de l'hôte vis-à-vis des biomatériaux, les études *in-vitro* préalables ne permettant que de suggérer leur potentiel thérapeutique et/ou leur innocuité. Afin d'évaluer au mieux les paramètres physiologiques entrant en jeu lors de l'implantation de biomatériaux nous proposons d'utiliser un modèle de comblement osseux, transposé chez le rat, dont les objectifs sont à la fois d'étudier la réparation de l'os à l'aide de biomatériaux innovants, optimisés (dopés en cations divalents et/ou mêlant différents matériaux destinés à la régénération osseuse) par comparaison à d'autres communément employés. Pour cela un défaut osseux sera réalisé puis comblé par les biomatériaux, dans le crâne de rats. Ce modèle est bien décrit, et très utilisé dans la mise au point de matériaux osseux. Il est bien toléré par les animaux. Afin d'obtenir des résultats exploitables scientifiquement en utilisant le nombre le plus faible d'animaux, 126 rats seront nécessaires au maximum sur les 5 ans du projet. L'ensemble des expérimentations seront réalisées dans le respect des textes réglementaires relatifs à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Ce projet s'inscrit dans une démarche éthique suivant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ce modèle physiopathologique n'a pas d'équivalent *in vitro*, la planification expérimentale a été menée en faisant appel à des points de contrôles (Go/No Go) ainsi qu'à une méthode statistique permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire à la validation des résultats et pouvant interrompre l'étude si les résultats risquent de ne pas être exploitables. Ce protocole a été rédigé en veillant à optimiser les conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux (enrichissement du milieu, visites régulières...), en tenant compte de la sensibilité des animaux ainsi que des contraintes liées à l'espèce. Ce projet tient compte des points limites et de la prévention et de traitement des douleurs pouvant résulter de l'étude afin d'assurer des souffrances les plus faibles possibles voire l'inexistence de souffrance et de favoriser le bien-être des animaux tout au long de leur vie. Il pourrait résulter de ces études une amélioration de la prise en charge chirurgicale des patients, des pistes de développement de nouveaux biomatériaux ainsi qu'une augmentation des connaissances en liens avec leur utilisation.

16168 Comprendre comment le cerveau encode, consolide, stocke et restitue nos souvenirs est fondamental en Neurosciences. Ces fonctions reposent sur une organisation très précise des cellules composant le cerveau et sur une connexion parfaite entre ces cellules. Lors du développement, les principales cellules du cerveau, les neurones vont se spécialiser en acquérant une forme asymétrique caractéristique, en développant un réseau de connexions important entre eux. Une malformation ou un dysfonctionnement de ces cellules et de leurs connexions peuvent avoir des conséquences sérieuses sur le fonctionnement du cerveau.

Il est maintenant connu que les protéines de la Polarité Cellulaire et Planaire (PCP) contrôlent la division asymétrique des cellules et la mise en place des connexions. Vangl2 est la protéine majeure de la PCP exprimée dans le cerveau des mammifères. Il est connu que cette protéine s'accumule dans la région de l'hippocampe, une structure très importante pour l'apprentissage et la mémoire. Cette région est particulièrement touchée lors du vieillissement physiologique et pathologique (Maladie d'Alzheimer par exemple), avec l'apparition de déficits cognitifs plus ou moins importants.

Nous soumettons ici l'hypothèse que Vangl2 en contrôlant le développement des circuits de neurones de l'hippocampe notamment du Gyrus denté (DG) et du CA3 au cours de la formation du cerveau, participe à l'âge adulte à la mise en place des processus d'apprentissage et de mémorisation et joue un rôle dans la modification de ces processus et des circuits sur lesquels ils reposent lors du vieillissement.

Dans ce projet, nous étudierons si l'impact de la mutation de Vangl2 a un impact sur différents processus mnésiques et comportementaux dépendants des circuits hippocampiques, comme par exemple la mémoire déclarative, au cours du vieillissement. Nous utiliserons des modèles animaux transgéniques permettant la délétion sélective de Vangl2 dans l'hippocampe : les lignées EMX1*Vangl2 et Vangl2 flox. Ces animaux ne présentent aucun phénotype dommageable. Pour étudier les effets de l'absence de Vangl2 au cours du vieillissement, les animaux seront soumis à des tests comportementaux sans douleur visant à évaluer leur mémoire à l'âge de 10 semaines. Ces tests seront répliqués chez les mêmes animaux vieux, à plus d'un an et demi. Une procédure de chirurgie sous anesthésie sera également effectuée sur certains animaux, soit pour marquer les connexions entre les neurones du DG et du CA3 et étudier leur morphologie, soit pour éliminer Vangl2 dans ces connexions chez les souris Vangl2 flox, grâce à l'injection de vecteur viraux. Cette procédure est effectuée sous anesthésie et un suivi post opératoire est mis en place pour limiter la douleur ressentie pendant et après la procédure. Le nombre total d'animaux utilisés sera de 223 souris.

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. Cependant, il est important, une fois nos hypothèses testées *in vitro*, de vérifier leur véracité sur des modèles animaux en effectuant des tests comportementaux.

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 223 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 20 animaux par groupe est nécessaire pour notre étude. Nous réduisons le nombre de souris utilisé en reproduisant les expériences sur les mêmes animaux à deux stades de vieillissement différents.

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 avec un nid végétal, surveillés régulièrement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place avec des mesures de soulagement (réhydratation, réchauffement, nourriture humidifiée ou sous forme de gel). 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.

16169 Chaque année, environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués à travers le monde, responsables de plus de 8 millions de décès. Les traitements contre les cancers ont profondément évolué ces dernières années et l'immuno-oncologie représente aujourd'hui une approche thérapeutique prometteuse dans ce domaine. C'est dans ce contexte que notre laboratoire a fait le choix de développer un anticorps thérapeutique dirigé contre un antigène tumoral particulièrement surexprimée dans de nombreux cancers. Différents formats de cet anticorps pourront être envisagés afin de sélectionner celui qui aura la meilleure efficacité anti-tumorale. Ces anticorps auront comme fonctionnalités majeures d'induire une cytotoxicité spécifique contre la cellule tumorale soit par ADCC (Antibody-dependant cell cytotoxicity) via l'engagement des récepteurs Fc dans le cas d'anticorps monoclonaux, associé à un recrutement spécifique des cellules NK dans le cas d'anticorps bispécifiques (NKCE, NK Cell Engager), ou soit par libération d'un agent cytotoxique lié à l'anticorps dans le cas d'anticorps couplés à une drogue cytotoxique (ADC, Antibody Drug Conjugate).

Le présent projet consistera à évaluer l'efficacité cytotoxique spécifique de cet anticorps sur des cellules tumorales *in vivo*.

Le projet s'articulera en plusieurs étapes :

- une première étape permettra d'évaluer les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie de ces anticorps dans le sang périphérique des animaux. Le but est d'optimiser les fréquences et doses d'administration de ces molécules pour l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale.
- dans un second temps, des tests fonctionnels de nos anticorps (ADCC ou NKCE) pourront être réalisés *in vitro* avec des cellules immunitaires provenant des souris de notre modèle d'intérêt.
- dans un troisième temps, l'efficacité anti-tumorale de nos anticorps sera évaluée sur des souris porteuses de tumeurs soit avec la greffe des cellules tumorales en sous-cutanée (SC) ou en intraveineuse (IV), soit par l'induction de tumeurs spontanée par l'injection d'un carcinogène en sous-cutanée. Ces tests *in vivo* permettront d'établir un classement de nos anticorps afin de déterminer notre candidat médicament.

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

- réduire : le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux et modes d'action de nos anticorps 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. Cette comparaison permettra ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.
- remplacer : 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 de ciblage spécifique de cellules tumorales, impossible à mimer *in vitro*.
- raffiner : Afin de limiter le stress, 2 à 5 animaux sont hébergés 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.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet sera de 9080 souris maximum sur 5 ans.

16170 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 facteur de transcription ATF4 est impliqué dans la réponse cellulaire à différents types de stress. Dans ces situations il est activé et régule l'expression de nombreux gènes du métabolisme. Dans ce

projet, nous souhaitons approfondir les connaissances sur l'implication d'ATF4 dans le métabolisme énergétique, principalement au niveau du foie. Pour cela, nous utiliserons des souris dont le gène ATF4 a été invalidé par ingénierie génétique au niveau hépatique spécifiquement. Ces souris, en comparaison d'animaux contrôles de type sauvage, seront soumises à diverses conditions afin d'étudier le rôle d'ATF4 hépatocytaire : lors de l'administration d'un activateur pharmacologique de l'expression d'ATF4, lors d'un afflux d'acides gras provenant du tissu graisseux et lors d'un régime riche en graisses et pauvre en sucres (régime cétogène) ainsi que lors du jeûne.

Ces différentes conditions permettront de connaître l'importance d'ATF4 dans la réponse métabolique de l'organisme à ces différentes conditions, notamment en terme de modification de la sensibilité à l'insuline. 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, muscles).

Nous utiliserons uniquement des souris adultes. Nous prévoyons d'utiliser, à raison de 8 à 12 animaux par groupe selon les expériences et au vu du nombre d'études à mener, 540 animaux sur 3 ans. Basé sur les données de la littérature et des expériences 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 fait intervenir le dialogue entre plusieurs organes dans la régulation des voies métaboliques. 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 de leur vie ainsi qu'au cours des expérimentations en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement, dans un environnement contrôlé, une surveillance quotidienne par le personnel et des enrichissements du milieu de vie (cabanes ou tubes plastiques dans les cages). Si un animal présente un signe quelconque de souffrance, nous prendrons les dispositions réglementaires nécessaires pour la soulager et l'animal sera aussitôt retiré de l'étude.

16171 Les influences maternelles jouent un rôle fondamental dans les processus de développement comportemental. Chez les oiseaux et les mammifères, le comportement de la mère pendant le maternage va influencer, de façon durable, les caractéristiques comportementales de ses jeunes que cela soit, en termes de comportements émotif, social, alimentaire ou de capacités cognitives. Les influences maternelles peuvent également intervenir avant la naissance du jeune, correspondant ainsi à des facteurs prénatals. Chez les mammifères, y compris l'homme, de nombreuses études ont ainsi mis en évidence un fort impact du stress maternel pendant la gestation sur le développement physique et comportemental du jeune. Ces effets apparaissent liés à l'impact des hormones maternelles de stress sur le développement neurobiologique de l'embryon. De plus, ces effets peuvent perdurer sur plusieurs générations, mettant ainsi en évidence des mécanismes de transmission transgénérationnelle du stress maternel. Chez l'oiseau, de tels effets prénatals existent également, même si contrairement aux mammifères, l'embryon d'oiseau se développe en dehors de l'organisme maternel. De précédents travaux ont mis en évidence la présence d'hormones d'origine maternelle dans l'œuf. Ces concentrations hormonales apparaissent être modulées par l'environnement de vie de la femelle pondeuse et affecter, en conséquence, le développement comportemental des descendants. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est d'analyser, chez un modèle oiseau, la caille japonaise, l'impact du stress maternel prénatal sur le développement comportemental de jeunes oiseaux. Il s'agira ainsi de comparer les caractéristiques comportementales d'oiseaux issus de mères stressées (lot S) et de mères non stressées (lot NS). Des analyses physiologiques et neurobiologiques seront également réalisées afin d'identifier des facteurs intervenants dans ces influences prénatales. Enfin, nous suivrons l'impact de ce stress sur 3 générations successives afin d'identifier des mécanismes de transmission transgénérationnelle.

Cette procédure implique l'utilisation de 528 cailles, réparties en 48 cailles fondatrices (génération F0), et 3 fois 160 cailleaux (génération F1, F2, F3 avec 80 individus par lot). Cette procédure a été élaborée en adéquation avec la règle des 3R :

- Remplacement : l'objet de cette étude étant de comprendre le développement du comportement animal, nous ne pouvons pas avoir recours à des méthodes d'analyse *in vitro*.
- Réduction : le nombre d'oiseaux prévu tient compte de la forte variabilité comportementale qui est observée chez l'animal. En effet, pour pouvoir mettre en évidence des différences significatives entre les lots, un minimum de 80 individus par lot doit être testé (soit 160 par génération). De plus, le sexe des cailleteaux ne pouvant être déterminés à l'éclosion, nous devons analyser les effets sexe à postériori, avec comme prévision un sexe-ratio de 50/50, soit avec 40 individus par sexe et par lot.
- Raffinement : les oiseaux sont élevés et maintenus dans des conditions adaptées à leur âge : en groupe au jeune âge et en logette individuelle à l'âge adulte. Les animaux en logette individuelle peuvent toujours avoir des contacts visuels, auditifs et tactiles avec des congénères. Lorsque le substrat est grillagé, un espace de repos est aménagé par la mise en place de gazon artificiel (astroturf).

16172 Les récepteurs à la douleur se distribuent dans notre organisme, aussi bien au niveau de la peau, que des organes profonds. Ces récepteurs spécialisés, aussi appelés nocicepteurs, transmettent l'information douloureuse de la périphérie vers le système nerveux central. Afin de traiter les douleurs, différents moyens ont été tentés pour couper le signal nerveux afférent responsable de la transmission de la douleur. C'est le cas des opioïdes. Bien qu'ils possèdent d'indéniables propriétés analgésiques, ils peuvent en outre être à l'origine d'effets indésirables. Par exemple, l'administration répétée de morphiniques est à l'origine d'un phénomène 'paradoxal' désigné par le terme d'hyperalgésie (hypersensibilité à la douleur) induite par les opioïdes. Ainsi l'utilisation des morphiniques pour la gestion de la douleur est à double tranchant. Ils fournissent initialement de réels effets analgésiques mais induisent parallèlement l'expression d'une hyperalgésie.

Notre projet a donc pour but de comprendre comment la morphine, utilisée de manière chronique, induit une hypersensibilité à la douleur. Les canaux ioniques sodiques sont des protéines essentielles à la conduction neuronale et à la propagation du signal douloureux. Ce sont les acteurs majeurs de la douleur inflammatoire et neuropathique. L'objectif de cette étude est donc d'évaluer si l'hyperalgésie morphinique est associée à des variations des signaux électriques des canaux sodiques Nav1.8 et Nav1.9, deux isoformes très représentées dans les nocicepteurs. Nous évaluerons également si le BDT0001, un nouvel inhibiteur du récepteur FLT3 possiblement impliqué dans l'hyperalgésie morphinique, est capable d'inhiber les effets de la morphine sur les canaux sodiques. Nous utiliserons des souris pour lesquelles l'expression des gènes Nav1.8 et Nav1.9 a été inactivée. Les résultats seront comparés avec ceux issus de souris ayant reçu un traitement sans morphine (bras témoin).

L'hyperalgésie induite par la morphine est un mécanisme complexe impliquant de nombreux processus cellulaires, différentes structures neuronales et différents organes. Son déclenchement est dépendant de la métabolisation de la morphine (dégradation partielle de la morphine par le foie) mais aussi de l'action directe de la morphine sur le système nerveux. Cette étude nécessite donc un système intégré et ne peut pas être réalisée *in vitro*. Pour effectuer ce projet, 160 souris seront utilisées afin de pouvoir comparer les conditions testées à l'aide de tests statistiques (Anova, Mann-Whitney non-paramétrique ou Wilcoxon) afin d'observer des différences significatives sur les paramètres étudiés avec un risque alpha fixé à 0.05. Ce projet a été conçu dans le souci d'optimiser la règle des trois « R » :

- Remplacement : modèle *in vitro* pour tester les différents métabolites de manière aigüe ;
- Réduction : nous étudierons l'effet de la morphine chronique uniquement sur des souris transgéniques déficientes soit pour les canaux Nav1.8, soit pour les canaux Nav1.9, afin de mieux circonscrire les mécanismes impliqués.
- Raffinement : des points limites adaptés seront mis en place lors de sa réalisation, et l'environnement des animaux sera enrichi avec des dômes en carton.

Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des douleurs induites par un traitement chronique à la morphine. Les résultats escomptés pourraient permettre de mieux contrôler les douleurs chroniques en utilisant la morphine, tout en minimisant ses effets secondaires.

16173 La schizophrénie est une pathologie psychiatrique qui provoque des troubles psychotiques et qui touche environ 1% de la population mondiale. Les symptômes de la schizophrénie résulteraient

d'une perturbation de la communication entre les neurones et plus précisément d'une dérégulation de la sécrétion synaptique de deux neurotransmetteurs – le glutamate et la dopamine- dans plusieurs aires cérébrales. La synapsine II (Syn II) est une protéine synaptique fortement exprimées dans les neurones qui régule la sécrétion de glutamate ou de dopamine. Or, des analyses post mortem ont montré des expressions anormalement basses de Syn II dans des cerveaux de patients schizophrènes. Par ailleurs, des mutations du gène de Syn II pourraient être impliquées dans l'étiologie de la maladie.

L'objectif général de ce projet est de mieux comprendre le rôle de Syn II dans la schizophrénie. Pour cela, nous disposons d'une souche de souris transgénique n'exprimant plus Syn II (souris Syn II KO). Les données comportementales sur les souris Syn II KO sont assez lacunaires et au préalable à toute étude physiologique il nous apparait indispensable de faire un phénotypage comportemental complet de ces souris afin de vérifier qu'elles répondent bien aux critères comportementaux associés aux modèles murins de la schizophrénie (troubles sensorimoteur, dépression, stress, anxiété, anhédonie, retrait social, hyper locomotion).

Remplacer : Au vu de notre objectif 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 nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

Réduire : Les expériences seront 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, chaque étude de base comporte un groupe témoin et un groupe transgénique, de chaque sexe, de 20 sujets chacun soit 80 animaux. Le groupe transgénique est constitué d'animaux issus de la même souche que les sujets non modifiés génétiquement. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés, chaque étude de base regroupe un ensemble de tests comportementaux dont l'enchaînement est compatible avec le bien-être de l'animal, ce qui permet de réduire grandement l'effectif.

Raffiner : Les animaux sont hébergés dans des animaleries dont le fonctionnement a été conçu pour maximiser le confort et limiter la souffrance des animaux. En particulier, les souris sont hébergées en cohorte, elles font l'objet d'observations régulières tout au long de l'expérience, l'enrichissement (carrés de coton pour favoriser la nidation, barreaux de bois à ronger et roue d'activité) est systématiquement appliqué à toutes les cages. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress. Des points limites ont été établis afin de soustraire l'animal à la souffrance. En cas de nécessité des décisions seront prises en accord avec le vétérinaire, la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux (SBEA) et/ou le personnel zootechnique de l'institut pour stopper tout signe de mal-être de l'animal.

Ce projet prévoit d'utiliser un nombre maximal de 980 animaux.

16174 Les médicaments antirésorbants, en particulier les bisphosphonates, sont des médicaments prescrits dans la prévention et le traitement des hypercalcémies malignes et/ou des métastases osseuses. L'ostéochimionécrose des mâchoires (ONM) constitue l'un des effets secondaires les plus redoutables de cette thérapeutique médicamenteuse car elle impacte négativement la qualité de vie des patients atteints. Elle survient le plus souvent après des soins dentaires et en particulier une extraction dentaire. Sa pathogénie, certainement multifactorielle, pose des problèmes complexes et encore imparfaitement résolus. Les principaux mécanismes actuellement débattus reposent sur une absence de cicatrisation osseuse, avec diminution du remodelage osseux et altérations des propriétés biomécaniques, et une infection primitive et/ou secondaire par les bactéries de la flore buccale. La prévention du risque d'ONM est primordiale. Malheureusement, il n'existe toujours pas à ce jour de consensus, sur le traitement préventif optimal à mettre en place.

L'objectif de cette étude est d'évaluer de potentielles nouvelles thérapies (Low-Level Laser Therapy ou LLLT, et biomatériaux fonctionnalisés) susceptibles de réduire le taux de survenue d'ONM induite par la prise de zoledronate.

Des études préalables in-vitro au laboratoire ont permis de sélectionner les modalités d'emploi de la LLLT et les biomatériaux les plus efficaces.

Ce projet prévu sur 5ans, utilise un modèle expérimental d'ONM, parfaitement décrit et validé chez le rat permettant d'obtenir un taux d'ONM d'environ 80%.

Le nombre d'animaux pour cette étude correspond aux effectifs minimaux nécessaires à l'obtention de résultats fiables et statistiquement significatifs Une stratégie « go- no go » sera mis en place afin de limiter le nombre d'animaux strictement nécessaires. Un nombre maximal de 32 rats par lot sera considéré, pour un effectif total maximal de 256 rats sur 5 ans. Toutes les précautions seront prises afin de réduire et raffiner les expérimentations. Un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance La souffrance des animaux ne devrait pas dépasser un niveau de contrainte modérée équivalent à un jeûne forcé pendant 48 heures. En cas d'atteinte de pointes limites (perte de poids > 20%), la mise à mort de l'animal sera anticipée.

La réalisation de ce projet constitue un prérequis indispensable afin de confirmer ou non l'efficacité de thérapie préventive anti-ONM avant d'envisager leur utilisation dans le cadre d'essais cliniques.

16175 Mots clés : cancer, modèles tumoraux d'ostéosarcomes, orthotopique

La majorité des ostéosarcomes (70%) surviennent chez les adolescents et les jeunes adultes. Les ostéosarcomes ont une dissémination métastatique souvent précoce avec un envahissement fréquent des poumons, ce qui rend ce type de cancer extrêmement complexe à soigner. La chimiothérapie et la chirurgie conservatrice sont aujourd'hui les traitements préconisés mais avec des séquelles qui peuvent être importantes, c'est pourquoi il est important de trouver de nouvelles combinaisons prometteuses. Pour ce faire nous souhaitons développer des modèles d'ostéosarcomes implantés en orthotopique (càd situé à son emplacement anatomique habituel) à savoir en intra-tibial afin de suivre le développement tumoral chez la souris. 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) dans une situation qui prend en compte l'organe impliqué est nécessaire dans le contexte des immunothérapies que nous souhaiterons tester par la suite. Ce premier protocole vise donc à déterminer comment les lignées cellulaires d'ostéosarcomes se développent, afin d'appréhender au mieux les points limites associées à la procédure d'implantation.

Retombées attendues : Cette étude permettra le développement d'un modèle d'ostéosarcome stable.

Type d'espèces et nombres d'animaux : cette étude sera réalisée sur souris immunocompétentes avec un effectif total prévu de 60 souris

Prise en compte des 3 R : a) Remplacement : cette étude cherche à étudier la croissance tumorale pour ensuite déterminer 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, avant la mise en place du protocole les souris seront acclimatées aux expérimentateurs du projet afin de limiter leur stress. Les animaux seront observés 3 fois par semaine 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, l'implantation tumorale sera effectuée sous anesthésie et un analgésique sera également utilisé dans les procédures de chirurgie afin d'enrayer la douleur chez l'animal.

16176 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.

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 nouveaux modes d'irradiation. Le choix de cette technique permet de réduire de façon significative le nombre d'animaux en suivant les mêmes animaux au cours du temps par rapport à une analyse histologique post-mortem.

Les examens IRM se feront sous anesthésie gazeuse, pour éviter tout stress aux animaux. Ces derniers seront observés à plusieurs moments ((2, 7, 14, 21, 30, 40 jours, 3 et 6 mois après irradiation). Après l'imagerie, les animaux retournent dans leur établissement utilisateur d'origine pour leur hébergement et suivi.

Nos critères d'évaluation pour l'efficacité des modes d'irradiation vont porter sur la préservation des tissus sains environnants la tumeur et sur le contrôle de la croissance des tumeurs irradiées et les mécanismes biologiques impliqués. Les principales hypothèses sont liées à l'implication du système immunitaire. Aussi, le recours à des méthodes alternatives n'est pas envisageable dans ce projet et il nous est indispensable de développer des modèles animaux (une culture *in vitro* de tissus ne permettrait pas d'apprécier l'effet des traitements, ni un modèle *in silico*). En effet, les rongeurs sont particulièrement utilisés en cancérologie et dans les études de radiothérapie car il s'agit d'espèces génétiquement caractérisées et pour lesquelles les références bibliographiques sont très nombreuses dans la littérature ayant trait au domaine de la radiothérapie. 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.

Pour la réalisation de ce projet, 1182 rats seront inclus dans des groupes de traitement comportant différentes doses et différentes configurations d'irradiation. Le projet a une durée de 5 ans.

Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible. 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), les conditions d'hébergement des animaux sont 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.

16177 Nos molécules d'intérêt sont impliquées dans le contrôle du développement de certaines tumeurs cancéreuses. Notre travail a mis en évidence que la présence de ces molécules entraînait un retard de migration des cellules tumorales *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo* dans un modèle de mélanome murin. Nous ne connaissons pas l'effet de nos molécules sur le développement du cancer du côlon.

Ce projet a pour but d'évaluer le potentiel thérapeutique de nos molécules d'intérêt dans le cadre du développement du cancer du côlon. Les résultats obtenus pourraient permettre d'utiliser ces molécules pour le traitement du cancer du côlon chez l'Homme. Les dommages attendus chez l'animal sont une inefficacité du traitement avec développement de métastases.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement des cellules cancéreuses dans un organisme entier vivant. Le comportement de ces cellules dépend de très nombreux facteurs et notamment de son environnement direct.

La souris BALB/c a été choisie comme modèle car elle est appropriée pour la mise en place d'un modèle tumoral et son caractère consanguin renforce la probabilité d'une pousse tumorale homogène. Le stress des animaux sera pris en charge : en respectant une période de stabulation de 7 jours après réception ; en hébergeant les animaux en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie; et en leur mettant à disposition un enrichissement matériel spécifique à l'espèce utilisée.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites seront mises en place.

Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal suivant une grille établie lors des expérimentations précédentes et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible. Toute anomalie clinique sera rapportée au responsable sanitaire de

l'établissement. Des mesures thérapeutiques seront prises pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides / analgésiques, isolement, réchauffement, etc).

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux (40 souris pour la procédure 1 ; 50 souris pour la procédure 2 ; 80 souris pour la procédure 3) est limité pour un total de 170 souris au maximum sur l'ensemble du projet. Le nombre d'animaux utilisés est donc limité mais suffisant pour réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus. Les procédures 2 et 3 ne seront réalisées que si la procédure précédente permet l'obtention de résultats significatifs et significatifs.

16178 L'obésité est un problème majeur de santé publique avec une augmentation constante de sa prévalence. L'exposition quotidienne aux polluants environnementaux comme les perturbateurs endocriniens (PE) peut contribuer au développement de l'obésité et aux troubles métaboliques associés. Un sous-ensemble de ces PE a été nommé « obésogène » et sont alors des perturbateurs métaboliques. On y trouve par exemple les organoétains, les parabens, les phtalates, les biphényles polychlorés et autres classes de PE vu leur capacité à interférer avec le système endocrinien, y compris celui qui régule le métabolisme du tissu adipeux. Ces PE obésogènes sont des composés qui font partie des produits de consommation courante et des produits industriels auxquels les humains sont exposés par des voies multiples, notamment par ingestion, inhalation, injection, contact transdermique et transport transplacentaire.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) possède de nombreux avantages méthodologiques pour étudier les facteurs génétiques et/ou environnementaux pouvant induire des pathologies de l'espèce humaine. Son génome est entièrement séquencé et présente un fort pourcentage de gènes homologues avec celui de l'espèce humaine. Il est un excellent organisme modèle pour l'étude des maladies métaboliques humaines comme l'obésité car il possède un métabolisme lipidique organisé de façon similaire à celui de l'humain et tous les organes clés nécessaires au contrôle métabolique y sont présents. De plus, chez le poisson zèbre, comme chez les mammifères, l'excès d'énergie est stocké sous la forme de gouttelettes lipidiques dans des adipocytes. Par ailleurs, divers outils d'imagerie *in vivo* sont applicables du fait de la transparence optique des embryons et des larves. Les larves de poisson zèbre offrent un système unique pour étudier la formation et l'expansion des adipocytes et de l'adiposité de l'organisme entier en temps réel chez un vertébré vivant par l'utilisation du « zebrafish obesogenic test » (ZOT). Cette méthode permet d'examiner les effets de la composition des aliments, de médicaments et de contaminants environnementaux, seuls ou en combinaison, sur la dynamique de la quantité du tissu adipeux chez la larve de poisson zèbre. Le ZOT permet ainsi d'évaluer l'effet potentiellement obésogène et anti-obésogène des molécules chimiques et pharmacologiques et d'en analyser le mécanisme d'action.

L'objectif principal de ce projet est d'effectuer la validation du ZOT sur plusieurs sites dont nos installations, afin de pouvoir engager sa certification réglementaire auprès de l'European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) et de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE). En effet, les outils de test actuels, y compris les tests réglementaires *in vivo* sur les rongeurs, ne sont pas suffisants pour dépister facilement les effets d'un grand nombre de produits chimiques et de leurs mélanges. Le ZOT peut être considéré comme une étape intermédiaire, entre les tests *in vitro* et ceux appliqués chez les rongeurs, en fournissant des données pertinentes *in vivo* sur les effets indésirables et le mode d'action endocrinien des PE dans le contexte de l'obésité. Les travaux engagés concernent une l'étude de la reproductibilité et de la fiabilité du ZOT.

D'un point de vue expérimental notre projet consiste à tester le test ZOT en vue de sa validation, sur des larves âgées de 6 à 8 semaines et d'une longueur comprise entre 8 et 9 mm et à étudier les effets des différents PE. Le projet, nécessitera ainsi 5600 larves au maximum. Préalablement à ce projet, des études de toxicité auront été réalisées permettant de déterminer trois concentrations pour chaque toxique, à utiliser pour les expériences ZOT.

Les procédures expérimentales mises en œuvre s'effectueront au plus proche des conditions physiologiques de vie de l'animal avec des enceintes et eau chauffées à 28°C. A la fin de l'expérimentation, les larves exposées aux PE ayant été enrôlées dans les tests d'obésité seront euthanasiées par sédation profonde puis congélation. Dans nos procédures, le respect de la règle des

3R est suivi à chaque étape. D'abord, bien que le recours à l'expérimentation animale soit nécessaire, ce modèle peut être considéré comme intermédiaire ou substitutif aux modèles rongeurs (3R : Remplacement). En outre, la réduction du nombre d'animaux utilisés pour les tests d'obésité est assurée par le suivi individuel de l'animal. Ceci engendre un grand nombre de données individuelles permettant de limiter le nombre de réplifications des expérimentations grâce à une statistique utilisant l'appariement des données (3R : Réduction). Les études seront conduites dans le respect des normes les plus strictes en matière de soins des animaux et d'évaluation de la souffrance animale (3R : Raffinement). Les animaux seront maintenus dans des installations modernes et agréées pour assurer un confort maximal aux animaux (3R : Raffinement). Tout le personnel impliqué dans le travail des animaux a suivi une formation conformément aux réglementations institutionnelles et aux lois nationales relatives à la protection des droits des animaux (3R : Raffinement).

16179 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. Notre équipe s'intéresse à la région la plus ventrale du cortex que l'on appelle le pallium ventral d'où proviennent les premiers neurones générés dans le cerveau. Nous voulons comprendre quels sont les gènes responsables de la génération et de la diversité des neurones produits dans le pallium ventral en observant les conséquences sur l'identité neuronale de la surexpression de gènes candidats dans le cerveau embryonnaire murin.

Pour cela nous allons utiliser une technique de chirurgie permettant de modifier génétiquement une partie des cellules progénitrices du cerveau au cours du développement. 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 animal indispensable à la réalisation de ce projet. De plus, le cerveau de ces animaux se forme de manière très similaire aux autres mammifères ce qui en fait un très bon modèle d'étude.

Durant les 3 années que dure ce projet nous allons utiliser au total 84 femelles gestantes et 252 embryons.

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 » (remplacer, réduire, raffiner), 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 de la procédure opératoire et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. Une grille de suivi contenant des points limites détaillés sera mis en place et permettra un suivi quotidien attentif des animaux après la chirurgie. L'atteinte d'un ou de plusieurs points limites entrainera l'euthanasie des animaux.

À terme, les résultats de ces travaux pourront nous permettre de mieux comprendre l'origine de la diversité neuronale chez les mammifères.

16180 Le diabète est un problème de santé publique qui atteint plus de 460 millions de personnes dans le monde. Les patients présentent de nombreux symptômes très divers mais notamment des problèmes de cicatrisation avec des blessures qui ont des difficultés à cicatriser, appelées plaies chroniques. La cicatrisation peut se décomposer en plusieurs phases : une phase vasculaire et inflammatoire, une phase de réparation et une phase de maturation (remodelage).

Ce projet de recherche vise :

- A mieux comprendre la cicatrisation de la peau chez la souris dans un contexte diabétique (diabète de type I et de type II, régime obésogène riche en sucre/gras) suite à des plaies de différentes natures.
- A étudier l'effet de différents traitements visant à améliorer la cicatrisation de la peau chez la souris.

Le protocole utilisé sera conforme aux exigences des 3R de la réglementation française concernant l'expérimentation animale.

La cicatrisation est un processus naturel qui permet à la peau de se refermer. Souhaitant étudier les défauts de cicatrisation liés au diabète et l'effet de différents traitements sur les blessures, cette approche ne peut se faire que par l'utilisation du modèle souris.

Pour chaque procédure, le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs sera utilisé.

Les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi afin d'éviter le stress. Un personnel qualifié s'assurera du bien-être des animaux au quotidien. L'apparence physique, le comportement et la réponse à des stimuli externes seront observés 3 fois par semaine et la procédure sera stoppée si l'animal présente des signes de mal-être.

Lors des inductions de plaie, les souris seront sous anesthésie générale. A la suite de plaies, les souris bénéficieront d'un traitement antalgique sur plusieurs jours.

Pour le suivi de la cicatrisation nécessitant une immobilisation des souris et afin de limiter leur stress, celles-ci seront maintenues sous une légère anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

En cas d'atteinte d'un point limite en cours d'expérimentation, la souris sera mise à mort.

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 1680 souris sur une période de 5 ans.

16181 Les maladies chroniques du foie d'origine non alcoolique (NAFLD) sont caractérisées par une accumulation de graisses (stéatose) dans le foie dans plus de 5% des cellules hépatiques, en absence de toute consommation d'alcool / de médicament ou d'hépatite liée à une infection virale 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 générale à l'heure actuelle (70% chez les patients souffrant de diabète), les estimations prédisent que 33% de la population mondiale souffrira de NAFLD en 2030. Certains patients (~10-40% des personnes atteintes de NAFLD) développent une forme plus sévère de la maladie : la stéato-hépatite d'origine non alcoolique (NASH) qui se caractérise alors par une accumulation de graisses dans les hépatocytes, un ballonnement des cellules hépatiques et une inflammation pouvant aboutir à une fibrose. Dans les cas extrêmes, la NASH peut évoluer vers une cirrhose non alcoolique voire un cancer du foie. La mortalité chez les patients atteints de NASH est d'environ 7% dans la population générale et peut atteindre 36% chez des personnes souffrant de maladies cardio-vasculaires. De plus, il a été observé qu'un développement d'une NAFLD/NASH était associé à un risque accru de maladies coronaires (angor, infarctus du myocarde), de modifications fonctionnelles et structurelles du cœur (hypertrophie myocardique, fibrose et dysfonction diastolique), de troubles du rythme cardiaque (fibrillation auriculaire) et d'évènements thrombo-emboliques. Enfin, la NASH est en train de devenir la première cause de transplantation du foie aux Etats-Unis. 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 sur le marché dans cette indication précise.

Si de nombreux modèles de NASH sont largement décrits chez le rongeur, les modèles chez le porc le sont moins. Pourtant, ils sont indispensables pour le développement de candidats médicaments et pour la compréhension de la pathologie NASH et de ses complications cardiaques associées puisque le porc présente de nombreuses similitudes avec l'homme en termes de métabolisme et de maladies cardiovasculaires. Ces modèles porcins de NASH permettent ainsi une évaluation plus précise de l'efficacité des candidats médicaments avant leur évaluation chez l'homme. Les objectifs de ce projet sont ainsi :

-De caractériser l'effet de candidats médicaments, présélectionnés dans des tests vitro et dans des modèles de NASH murins sur des critères de sélectivité et d'efficacité sur les cibles d'intérêt, dans un modèle de NASH induit chez le porc.

-De caractériser les dysfonctions cardiaques de ce modèle et l'effet de candidats médicaments sur la dysfonction cardiaque associée à la NASH

Les études réalisées dans le cadre de ce projet permettront de documenter le mécanisme d'action des composés et d'évaluer leur effet sur la NASH et la fibrose en termes de réduction de la NASH et/ou de ralentissement de l'évolution vers des maladies/complications plus sévères (fibrose et complications cardio-vasculaires). Les conditions expérimentales utilisées dans ce projet sont basées sur les conditions qui ont été utilisées lors d'une étude préliminaire externalisée dont le but était de mettre en place et caractériser le modèle. Ainsi, les porcs seront alimentés pendant 3 mois avec un régime riche en graisses et en cholestérol, mais qui ne contient pas de choline et très peu de méthionine, acides aminés essentiels à l'élimination des graisses et du cholestérol contenu dans le foie. Ce régime permet ainsi d'induire la pathologie NASH associée à une fibrose hépatique chez le porc. La durée de 3 mois maximum de régime vise à limiter l'apparition de signe de souffrance et le développement d'une pathologie hépatique trop sévère. Le poids des animaux sera mesuré chaque semaine dès la mise sous régime. Les traitements avec les candidats médicaments seront initiés après un mois de régime afin que la pathologie soit déjà existante au moment du début du traitement et dureront 2 mois. L'effet du traitement chronique sera évalué de façon longitudinale 1) sur la NASH par des critères d'imagerie non invasive (échographie standard et échographie avec cadence d'acquisition ultrarapide, Fibroscan® permettant de déterminer la fibrose hépatique), d'histologie et des paramètres métaboliques et 2) sur la fonction cardiaque par des mesures de fréquences cardiaques, de pressions artérielles et ventriculaire et d'électrocardiogramme.

Si un candidat médicament peut être sélectionné par des techniques *in vitro*, son efficacité sur la pathologie ne peut être évaluée qu'après un traitement chronique chez l'animal, car elle 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* substitutives.

Les porcs seront hébergés à 2 dans des boxes, afin d'assurer le lien social, avec un enrichissement du milieu (balles et objets à mordiller), un changement de leur litière quotidien, et la distribution de l'aliment directement dans la litière ce qui leur permet d'exprimer leur comportement naturel de fouissement et de manipulation de matériaux. Ils feront l'objet d'une surveillance visuelle et comportementale quotidienne, ainsi que d'un suivi de poids, de prise alimentaire régulier par les expérimentateurs et le personnel de zootechnie. Si les points limites prédéfinis devaient être atteints, les porcs seront systématiquement euthanasiés.

Afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse statistique de l'effectif nécessaire a été réalisée dans ce modèle sur l'étude préliminaire. Dans le cadre de notre approche de recherche de nouvelles molécules, on estime à 36 animaux par étude et on pense réaliser 3 études sur la durée totale du projet (1 an), soit une prévision de 108 porcs.

16182 Les preuves des effets des perturbateurs endocriniens (PE) sur la santé humaine se sont accumulées au cours des dernières années montrant ainsi des liens avec les cancers, les troubles neurocognitifs, l'infertilité, les maladies immunitaires mais également des pathologies devenues un problème majeur de santé publique : les maladies métaboliques, comme le diabète, la résistance à l'insuline, l'obésité et certaines maladies du foie. C'est le cas de la stéatose hépatique (foie gras) qui peut évoluer en stéatohépatite, propice à la survenue de cirrhoses/cancers. Il apparaît donc urgent de répondre aux préoccupations des instances françaises et européennes de réglementation concernant l'impact des PE sur la santé humaine. Pour cela, il est donc nécessaire de développer de meilleurs moyens d'évaluer les effets biologiques des molécules suspectées, particulièrement dans le contexte des maladies du foie.

C'est dans ce cadre qu'un projet financé par le programme européen Horizon 2020 sera initié prochainement. Celui-ci vise à améliorer les approches d'évaluation actuelles en élaborant des tests pour détecter les troubles métaboliques liés aux perturbateurs endocriniens en développant, améliorant et validant une batterie de systèmes de tests complémentaires mêlant des approches *in vitro* et *in vivo* mais aussi des études épidémiologiques et *in silico*.

Dans ce contexte, une partie du projet est de développer des essais biologiques basés sur la larve de poisson-zèbre (*Danio Rerio*) pour dépister les perturbateurs endocriniens impliqués dans la progression de la stéatose vers la stéatohépatite. En effet, ce modèle a été identifié comme un modèle

de choix car (i) il s'agit d'un organisme entier présentant les interactions entre cellules et entre organes, impossible à reproduire *in vitro* (Remplacement); (ii) il est proche de l'homme au niveau du fonctionnement du foie. En outre, l'utilisation des larves de poissons-zèbres s'accorde avec la notion de remplacement en évitant le recours à des modèles mammifères (rongeurs, chiens, porcs ou primates). Concrètement, des larves de poisson-zèbre recevront une alimentation enrichie en graisse qui conduira à l'installation d'une stéatose hépatique avant d'être exposées à des agents chimiques de référence (connues pour induire ou non le passage vers la stéatohépatite) ou aux perturbateurs endocriniens suspectés. Pour cela il est prévu d'utiliser 25500 larves de poissons-zèbres de souche sauvage pour assurer le développement et la validation de ces essais ainsi que pour réaliser le criblage de 10 perturbateurs endocriniens. En parallèle, ces expériences seront reproduites sur une lignée de poisson-zèbre transgénique présentant un foie exprimant un marqueur visualisable. L'utilisation de cette lignée devrait ainsi permettre d'augmenter les capacités de criblage des tests développés. Au total, il est donc prévu d'utiliser 51000 larves de poissons-zèbres pour ce projet d'une durée de 4 ans. Une attention particulière a été portée sur le nombre d'animaux pour en n'utiliser que le minimum nécessaire : en limitant au maximum les utilisations répétées, en s'accordant avec les capacités techniques de l'installation tout en garantissant l'obtention de résultats statistiquement exploitables (Réduction). Les larves seront élevées dans les conditions optimales préconisées et tous changements de comportement/santé seront surveillés en respectant les points limites fixés (Raffinement). Les procédures expérimentales jugées comme pouvant induire un stress ou une douleur excessive seront réalisées en présence d'un composé anesthésique et antalgique (Raffinement).

16183 Au début des années 1990, les premières balises électroniques ont été développées et placées sur des animaux afin de suivre et d'enregistrer des informations sur leur environnement et leurs mouvements de migration. Toutefois, ces balises sont très chères (>4 000€) ce qui limite le nombre de déploiements et ainsi la robustesse statistique des analyses, elles sont également encombrantes, ont très peu évolué depuis leur développement et les capteurs embarqués ne peuvent pas être modifiés pour mieux correspondre aux besoins des scientifiques.

Le projet IOT « Indian Ocean sea Turtles » propose de développer de nouvelles technologies pour le suivi des mouvements des tortues marines basés sur le système de transmission LoRa utilisé pour les objets connectés. Outre la miniaturisation, le faible coût et la faible consommation énergétique des futures balises innovantes, ce système de transmission peut également être utilisé pour déterminer la position des objets en utilisant un réseau de stations de réception qui triangulise la position du signal émis par les objets. Le système GPS est en effet difficile à mettre en œuvre dans le milieu aquatique.

Le projet « IOT » a pour objectif principal de développer une nouvelle génération de balises et station de réception innovantes en vue du déploiement d'un premier réseau régional d'observation des mouvements de tortues marines à fine échelle, dans le bassin sud-ouest de l'océan Indien et à la pré-industrialisation de 60 balises de nouvelle génération.

Un maximum de tests sur les balises sera réalisé en laboratoire avant d'être testées dans un milieu contrôlé sur des individus présents dans les bassins d'un centre de soins sur 5 tortues, puis en milieu naturel sur les sites d'étude.

Sur les 60 balises du projet, 45 seront déployées sur les sites d'étude français dans l'océan Indien, plus 5 pour les tests en bassin.

La demande concerne donc 50 individus sur le territoire français.

Les procédures expérimentales prévues suivent les recommandations des spécialistes en termes de standards de collecte et de manipulation des animaux. Chacune de ces manipulations sera encadrée par des personnes disposant des connaissances et de l'expérience nécessaires à leur bonne réalisation et titulaires des diplômes et ou formations requis. Elles seront conformes aux règles d'éthique en matière d'expérimentation animale. Une attention particulière sera portée au bien-être des animaux pendant toute la durée de l'application de ces procédures.

Le projet prévoit le respect des principes des 3R et du bien-être des animaux, l'application des protocoles expérimentaux validés, ainsi qu'une gravité de classe « légère » des procédures expérimentales, afin de réduire leur effet cumulatif.

16184 L'intestin constitue un organe particulier avec une interaction forte et équilibrée entre d'une part la muqueuse intestinale, qui a pour vocation d'absorber les nutriments, d'autre part la flore bactérienne qui contribue à digérer certains aliments, et enfin le système immunitaire qui protège l'organisme d'attaques extérieures. La voie métabolique dite de la kynurénine constitue l'un des régulateurs clés de cette homéostasie intestinale en régulant le système immunitaire et la composition de la flore intestinale. Pour mieux en comprendre les rouages, il est important de connaître au sein de l'organisme quelles cellules expriment les acteurs de cette voie. L'étude de l'un de ces acteurs s'effectuera en analysant son expression par immunohistochimie (détection de la protéine avec un anticorps spécifique) sur des souris sauvages ou dans lesquelles le gène correspondant est spécifiquement délété (vérification dans cette condition de l'absence de signal). L'utilisation de souris génétiquement modifiées est nécessaire à la fois pour étudier l'expression dans un organisme complexe et avoir la possibilité en éteignant le gène de s'assurer de la spécificité du signal. Pour respecter la règle des 3R, un nombre maximum de 12 souris (3 WT et 3 KO pour chaque sexe) sera engagé dans la procédure, pour couvrir l'intégralité des organes des deux sexes et s'affranchir d'une éventuelle variabilité d'un individu à l'autre. L'ensemble des tissus sera prélevé et analysé après une injection unique de tamoxifène en intrapéritonéale pour induire le KO du gène. Des points limites adaptés et bien définis permettent d'éviter tout stress et toute souffrance animale.

16185 L'hémostase est un phénomène physiologique résultant d'équilibres dynamiques complexes assurant la prévention des saignements spontanés, l'arrêt des hémorragies, la formation locale d'un caillot et sa dissolution.

L'équilibre hémostatique peut être dérégulé dans un sens: c'est l'accident thrombotique ou dans l'autre: c'est l'hémorragie.

De nombreuses pathologies sont liées à des troubles de l'hémostase. C'est le cas de la thrombose veineuse et de l'accident vasculaire cérébral (AVC). La thrombose veineuse peut induire un grand nombre de complications sérieuses. En effet, le caillot va se détacher et migrer pour occlure un vaisseau de taille inférieure. Les traitements consistent en des thérapies thrombolytiques et anticoagulantes dont l'efficacité diminue drastiquement au cours de l'évolution du thrombus. Malgré sa prévalence; la prise en charge clinique de la thrombose veineuse reste très rudimentaire. L'AVC constitue une cause importante de mortalité et une cause majeure d'invalidité. Il peut être de type ischémique (87 %) ou hémorragique (13 %). La seule thérapie aujourd'hui administrée en clinique est le tPA, agent fibrinolytique, dont un faible pourcentage des patients peut bénéficier.

Il est important de développer de nouvelles thérapies pour augmenter l'efficacité des prises en charge actuelles et réduire les complications liées aux thromboses veineuses, à l'AVC et plus généralement aux troubles de l'hémostase.

L'hémostase comprend 3 systèmes physiologiques en équilibre dynamique:

- l'hémostase primaire avec les plaquettes sanguines
- la coagulation faisant intervenir plusieurs enzymes ou facteurs de la coagulation
- la fibrinolyse

Il existe des molécules ciblant ces différents systèmes.

Cependant, la prise en charge et le traitement des pathologies explicitées au préalable est à améliorer. De plus, il est primordial de s'assurer de l'innocuité de nouvelles thérapies.

Dans ce projet nous allons réaliser plusieurs études (n=520 rats Sprague-Dawley mâles de 7-8 semaines). La première est une étude de validation interne d'un modèle de type Wessler de thrombose veineuse chez le rat. Nous allons établir une relation dose-réponse entre l'administration d'un pro-coagulant et le poids du caillot généré ainsi que le profil de coagulation sanguin, qui seront les critères d'évaluations. Nous allons ensuite évaluer l'efficacité d'un anticoagulant bien connu : l'héparine sur la dose efficace retenue.

Nous nous baserons sur les résultats de cette première étude pour réaliser les études suivantes qui reprendront le même protocole.

Celles-ci vont consister à :

-Evaluer le risque thrombogène (la thrombogénicité) de nouveaux composés thérapeutiques pour le compte de clients industriels.

Il est primordial de s'assurer que les composés thérapeutiques qui ne sont pas à visée pro-coagulante ne présentent pas de caractère thrombogène comme effet secondaire. A l'inverse ; dans certaines pathologies telles que les hémorragies il est nécessaire d'avoir recours à des agents coagulants.

Dans ces études il y aura 5 groupes d'animaux : un groupe véhicule, un groupe recevant la dose de thromboplastine définie dans l'étude de validation et 3 groupes recevant le composé thérapeutique testé à différentes doses.

-Evaluer le potentiel anti-thrombotique/anti-coagulant ou thrombolytique de nouveaux composés thérapeutiques pour le compte de clients industriels.

Dans ces études il y aura 6 groupes d'animaux : un groupe véhicule, un groupe recevant la dose de thromboplastine définie dans l'étude préliminaire, un groupe recevant la dose de thromboplastine + héparine, 3 groupes recevant la thromboplastine + le composé thérapeutique testé à différentes doses.

Les modèles de thrombose ont initialement été développés chez le chien et le lapin. Depuis plusieurs décennies ces modèles sont adaptés chez le rongeur. Nous avons décidé d'utiliser le rat comme modèle du fait de la littérature qui caractérise le modèle chez le rat et offre des études comparatives d'autres molécules. De plus, le rat permet d'obtenir des tailles de caillots significatives, ce qui est plus difficile chez la souris. Il s'agit donc d'un intermédiaire idéal qui permettra de répondre à nos questions. Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale associée à une couverture analgésique et sont sans réveil.

Ce projet prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R comme décrit ci-dessous : le rat est une des espèces animales les plus étudiées dans le domaine de la thrombose veineuse dans les études contemporaines. Notre projet correspond à l'étape de validation préclinique de l'effet de candidats médicaments sur des mécanismes complexes intégrés que sont les processus de l'hémostase. Les processus étudiés ne nous permettent pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal. La littérature démontre que les études *in vitro* de stase ne sont en effet pas transposables à la clinique.

Sur la base des publications de la littérature spécifique nous avons estimé que 10 animaux par groupe seront suffisants pour observer des différences significatives nous permettant de valider notre interprétation des résultats. Cette étude de validation servira de base pour définir les doses utilisées dans les autres études.

Nous estimons évaluer une dizaine de composés thérapeutiques dans les prochaines années en utilisant ce modèle. La pharmacologie et la toxicité des composés thérapeutiques que nous testerons seront connues avant de réaliser les études. Les composés thérapeutiques que nous testerons seront non toxiques quelque soit la dose administrée.

Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Les animaux seront mis en jeun 12h précédant la chirurgie afin de favoriser l'approche chirurgicale. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Durant la procédure chirurgicale la profondeur de l'anesthésie est vérifiée. Les animaux ne sont pas réveillés suite à la procédure chirurgicale. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

Mots clefs : hémostase, thrombose veineuse, thrombotique ; coagulant ; anticoagulant ; thrombolytique, accident vasculaire cérébral

16186 La greffe de cellules souches hématopoïétiques (cellules permettant la production de toutes les cellules sanguines) est l'une des approches thérapeutiques dans le traitement des cancers du sang. Son objectif est de reconstituer un système immunitaire sain et d'éliminer les cellules cancéreuses. Malheureusement, une limite importante de l'utilisation de ce traitement dans les cancers est la survenue fréquente de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Cette maladie est due à la réaction d'une population particulière de cellules immunitaires du donneur contre les cellules du receveur. Les organes cibles sont essentiellement, la peau, le tube digestif et le foie. La GvHD survient chez 30 à

65% des patients et est responsable d'une morbidité à long terme et d'une mortalité qui peut atteindre 30% chez des patients généralement en rémission de leur cancer. Chez les patients atteints de GvHD, il a été montré que différentes molécules et populations cellulaires sont modifiées au cours de la maladie, notamment une molécule connue pour son rôle dans la mort cellulaire.

Afin d'approfondir ces résultats et mieux comprendre le rôle de cette molécule dans les atteintes tissulaires observées dans la GvHD, il est indispensable d'utiliser un modèle expérimental *in vivo*. Ce modèle est très largement décrit et robuste. Il consiste en l'injection de cellules hématopoïétiques issues de souris génétiquement modifiées (n'exprimant plus la molécule d'intérêt; ces souris ne présentent pas d'anomalie de développement ni de pathologie pouvant entraîner une souffrance) à des souris normales préalablement irradiées afin d'éliminer l'ensemble des cellules du système immunitaire. L'injection, non douloureuse, se fait par voie intraveineuse (veine de la queue) sur souris éveillée. Après administration, une partie des cellules présentes dans le greffon (cellules injectées) va reconnaître les cellules de la souris receveuse comme étrangères ce qui va entraîner une réaction du greffon contre l'hôte et l'apparition d'une pathologie proche de la GvHD humaine. Parallèlement à cette étude *in vivo*, nous réaliserons des tests *in vitro* sur une population cellulaire très impliquée dans la pathologie mais extrêmement rare dans les prélèvements de tissus. Afin de limiter le nombre de souris utilisées, nous réaliserons des injections intra-péritonéales (dans l'abdomen) à des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus la molécule d'intérêt d'un produit qui entraîne une inflammation et donc prolifération de la population cellulaire d'intérêt au bout de quelques heures. Ensuite nous euthanasierons ces souris entre 4h et 4 jours post-injection et nous récupérerons en post-mortem les cellules d'intérêt en grand nombre afin de mener les tests *in vitro* complémentaires nécessaires à la compréhension des mécanismes de développement de la GvHD.

Pour mener à bien ce projet, nous nous engageons à respecter la « règle des 3 R » comme suit :

- Remplacer: La GvHD étant une maladie complexe faisant intervenir de nombreux acteurs cellulaires et affectant de multiples organes, l'utilisation d'un modèle animal est indispensable. Aucun modèle *in vitro* ne permet de reproduire cette pathologie et l'accessibilité aux principaux organes cibles de la GVHD demeure très limitée chez les patients greffés. L'utilisation d'un modèle animal est absolument nécessaire pour l'étude des mécanismes d'induction et de régulation.

- Réduire: Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés dans ce projet au minimum nécessaire et suffisant pour satisfaire la validité scientifique de l'étude, en particulier au niveau de l'analyse statistique de type ANOVA qui nous permet des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux (10 à 14 souris par groupe). Ainsi nous utiliserons 230 souris développant une GvHD et 120 souris pour obtenir les cellules utilisées dans les tests *in vitro*, sur toute la durée du projet (3 ans).

- Raffiner: Les animaux seront pesés trois fois par semaine et évalués quotidiennement selon une grille d'évaluation comprenant différents aspects cliniques (posture et mobilité, poids, atteinte cutanée et diarrhées) et seront euthanasiés lorsque les critères d'arrêt définis sont atteints. Dès qu'un affaiblissement d'une souris est observé, de la nourriture gélibifiée sera ajoutée dans la cage. L'ensemble des souris sera euthanasiées au plus tard 60 jours après le début de la procédure d'induction de la GvHD ou entre 4h et 4 jours post-injection dans les expériences d'induction d'inflammation.

16187 Les cancers du sein sont les cancers les plus fréquents et les plus agressifs chez la femme. Plusieurs approches thérapeutiques sont utilisées (chimiothérapie, immunothérapie, radiothérapie) mais sans certitude de rémission et conduisant à plus de 10 000 décès par an en France. Il est donc important de mettre au point et de tester les meilleurs traitements possibles pour ce cancer.

Ce projet consiste à évaluer l'activité anti-tumorale de différentes approches thérapeutiques (chimiothérapie, immunothérapie, radiothérapie - associées ou non à une ablation chirurgicale de la tumeur) dans des modèles de tumeurs mammaires obtenues par greffe de cellules tumorales directement dans la glande mammaire de rongeurs (rat ou souris), la souris étant l'espèce animale la plus utilisée.

Après implantation, les cellules tumorales vont se multiplier pour former progressivement une masse tumorale. Le suivi de la progression tumorale pourra se faire par mesure de la masse tumorale superficielle à l'aide d'un pied à coulisse. Les techniques d'imagerie *in vivo* non-invasive permettent

également un suivi longitudinal de la croissance tumorale et du processus de métastase. En cours de suivi, des prélèvements de sang pourront être réalisés.

Pour ce projet d'une durée de 5 ans, il est prévu un nombre maximum de 1200 souris en nous basant sur 4 études par an : [60 souris/étude x 4 études/an x 5 ans=1200] et 300 rats en nous basant sur 1 étude par an : [60 rats/étude x 1 étude/an x 5 ans=300]

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

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.

Remplacement : Malgré l'effort constant de développement de méthodes alternatives pour limiter le recours à l'expérimentation sur les animaux, il existe actuellement de nombreuses questions scientifiques en oncologie, notamment concernant l'évaluation pharmacologique des candidats médicaments anti-tumoraux, auxquelles il n'est possible de répondre que par l'étude de la croissance de tumeurs *in vivo*. Il n'existe effectivement pas de méthode de substitution adaptée (*in vitro* ou *in silico*) pour répondre aux objectifs de ce projet. A ce jour, la souris et le rat sont les espèces qui sont les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement sera obtenu par :

- . le recours à des procédures les moins invasives et moins douloureuses possibles (par exemple, le suivi non-invasif des tumeurs notamment par imagerie)
- . le suivi d'éventuels signes cliniques
- . la mise en place de points limites adaptés
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- . un protocole analgésique adapté pour la chirurgie d'exérèse de tumeur et pour la période post-opératoire associé à un suivi de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

16188 Chez l'homme, la maladie polykystique rénale autosomique dominante (ADPKD) représente l'une des principales causes de l'insuffisance rénale d'origine génétique et touche plus d'une naissance sur 700-1000 et approximativement 13 millions de personnes dans le monde entier. La maladie est caractérisée par le développement bilatéral de kystes rénaux qui augmentent progressivement la masse de l'organe et conduit à la perte de la fonction rénale. Elle s'accompagne d'une hypertension artérielle et des kystes peuvent se développer également dans le foie et le pancréas. Des atteintes cérébrales vasculaires et cardiaques ainsi qu'au niveau du côlon sont décrites. C'est une maladie hétérogène qui provient de la mutation de l'un des 2 principaux gènes impliqués dans la sensibilité mécanique au flux urinaire, appelés Pkd1 et Pkd2. Les traitements habituels soignent seulement les symptômes. Un seul médicament montre une certaine activité qui reste limitée et qui s'accompagne d'effets indésirables. À l'heure actuelle, il n'y a aucune thérapie efficace contre la maladie et la dialyse et la transplantation d'organes restent l'ultime recours pour les patients atteints d'insuffisance rénale terminale. Le principal objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes déclenchant la formation des kystes dans les néphrons en élaborant des études sur des cellules provenant de patients et d'identifier de nouvelles petites molécules capables de corriger précocement la maladie. De nouveaux composés issus de notre Recherche seront testés pour leur efficacité *in vitro* sur les cellules humaines de patients. Les plus actifs d'entre eux et à condition qu'ils présentent des propriétés pharmacocinétiques acceptables *in vitro* et *in vivo* chez le rat ou la souris, seront évalués dans un modèle *in vivo* d'efficacité chez la souris. Notre démarche consistera à utiliser des souris issues du croisement de deux lignées transgéniques et chez lesquelles nous pourrions contrôler l'induction de la maladie en inactivant spécifiquement le gène Pkd1 par l'administration d'un agent extérieur. Le phénotype des souris restera non dommageable jusqu'à ce que sous l'action de cet agent, la maladie commence à s'installer avec formation et progression des kystes. Nous pourrions ainsi vérifier l'efficacité des molécules préalablement sélectionnées *in vitro*. Dans le cadre de ce projet, plusieurs

milliers de molécules seront produites et testées sur les cellules, notamment celles de patients atteints de la maladie, avant d'en sélectionner une dizaine pour l'évaluation *in vivo* chez la souris.

La maladie touchant les hommes et les femmes avec la même incidence, des souris mâles et femelles pourront être utilisées, ceci aura pour conséquence de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés dans ce projet.

Afin de limiter encore davantage le nombre d'animaux au strict nécessaire, nous utilisons un logiciel de lois statistiques permettant de calculer le nombre minimum de souris nécessaire pour montrer que l'effet de nos composés est significatif par rapport aux animaux malades contrôles.

Nous avons également mis en place une plateforme d'imagerie qui permettra de suivre l'évolution de la maladie et l'efficacité de nos composés chez les mêmes souris du début à la fin de l'étude, excluant ainsi le recours à des animaux supplémentaires pour des études séquentielles.

Chez le patient, la présence de kystes reste longtemps indolore et imperceptible jusqu'à ce que le volume kystique devienne important et qu'il entraîne une pesanteur et une douleur diffuse dans le flanc, le dos ou l'abdomen.

Notre stratégie est d'évaluer nos composés au stade précoce de la formation des kystes, lorsqu'ils ne présentent pas encore d'inconfort notable pour la souris. Cependant pour pallier ce risque éventuel, un programme d'analgésie sera mis en place et nous avons établi une liste de points limites au-delà desquels, les traitements seraient suspendus ou arrêtés.

Pour mener à bien ce projet, nous pensons que nous devons utiliser environ 635 souris par an pour les tests d'efficacité. Nous aurons donc besoin au maximum de 3175 souris sur une période de 5 ans. Les études de pharmacocinétiques utiliseront au maximum 660 souris et/ou 250 rats sur cette même période. Soit au total pour 5 ans : 4085 animaux.

Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé en continu (température, pression, hygrométrie, renouvellement d'air, alternance jour/nuit) relié à un système d'alarme qui s'activera en cas de dysfonctionnement. Ils bénéficieront d'un enrichissement du milieu adapté à l'espèce et à l'étude. La densité dans les cages sera en conformité avec les recommandations et autant que possible, les groupes d'animaux dans les études resteront ceux formés pendant l'acclimatation. Les animaux et leurs conditions d'hébergement (environnement, nourriture, eau de boisson) seront sous surveillance quotidienne.

16189 De nombreuses pathologies s'accompagnent d'une perte de masse musculaire (atrophie) soit de façon primaire, où le muscle est pathologique comme dans le cas des myopathies, ou secondaire, où la fonte musculaire est associée à une autre pathologie comme le cancer, le choc infectieux grave, l'accident vasculaire cérébral par exemple. Cette atrophie musculaire s'accompagne de façon quasi systématique d'une diminution de la force musculaire développée par le(s) muscle(s) atteint(s) et donc à une perte de fonction pouvant aller jusqu'à la perte de mobilité.

La myopathie centronucléaire autosomique dominante est associée à une mutation du gène Dynamine 2. La souris KI-Dnm2 constitue le seul modèle murin génétiquement altéré et exprime les symptômes de la maladie dans une forme modérée.

Au sein de notre laboratoire nous étudions les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont responsables tout ou partie de l'atrophie musculaire pathologique. L'évaluation de la force musculaire à l'aide d'un ergomètre permet d'obtenir une mesure pertinente de l'état général du muscle. Ces connaissances acquises nous permettent par la suite d'envisager des stratégies thérapeutiques innovantes.

L'ergomètre choisi pour réaliser les mesures de force fait référence au niveau international appareil de mesure de force et est dédié à l'utilisation chez le rongeur. Cet appareil nous permet de faire des mesures de force musculaire *in situ* au niveau du muscle tibial antérieur chez l'animal anesthésié. Une fine approche chirurgicale du muscle est nécessaire afin d'accéder au nerf sciatique qui l'innerve ainsi qu'au tendon distal qui sera relié à un transducteur permettant de réaliser les mesures de force. En utilisant des protocoles de stimulation électrique spécifiques nous pourrions également déterminer des propriétés contractiles telles que la vitesse de contraction, la force maximale, la fatigue musculaire et

la récupération de la force après plusieurs contractions musculaires successives. A l'issue des mesures et prélèvements, les souris seront mises à mort.

Dans ce projet nous cherchons à déterminer les effets du statut hormonal sur la faiblesse musculaire associée à la myopathie centronucléaire autosomique dominante, une maladie génétique au phénotype modéré y compris dans les stades avancés de la myopathie. Jusqu'à présent, nos données acquises chez les souris du genre masculin et rien à ce jour n'a été publié chez les souris du genre féminin. Notre hypothèse est que le niveau d'hormones oestrogénique chez la souris femelle apporte un certain niveau de protection contre la mise en place de l'atrophie musculaire comme cela a été démontré chez les souris modèle pour la myopathie de Duchenne. Pour vérifier cela, des souris mâles et femelles, myopathes ou saines, seront nécessaires à 4 âges différents : 1 mois soit avant la mise en place de l'atrophie musculaire dans les 2 sexes, 2 mois âge concomitant à l'apparition de l'atrophie chez les souris mâles, 8 mois puis 14 mois pour affiner l'âge d'apparition de l'atrophie musculaire chez les femelles dont le statut hormonal est physiologiquement modifié. Les données acquises seront comparées avec les valeurs de force musculaire développée par des souris saines aux mêmes âge et sexe. Ce genre de mesure est sujet à une certaine variabilité interindividuelle justifiant le recours à 10 animaux par groupes. Un total de 160 souris sera donc nécessaire (80 souris sauvages et 80 souris myopathes). Une fois la mesure de force musculaire réalisée, le muscle étudié et son controlatéral seront prélevés de façon à connaître leurs masses et déterminer leurs profils histologique et biochimique.

La mesure de force développée par un muscle entier et dans sa position anatomique ne peut être déterminé à partir de modèles *in vitro*. 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 géré grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2 à 4), 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.

16190 Avec l'environnement sanitaire, les paramètres conditions climatiques sont les principaux facteurs environnementaux affectant les performances des porcs dans les principaux bassins de production mondiaux. Parmi les solutions actuellement disponibles pour l'éleveur, les stratégies alimentaires sont assez largement utilisées. L'utilisation d'additifs (acides aminés fonctionnels, molécules antioxydantes, probiotiques) permet généralement de réduire l'hyperthermie des animaux au chaud mais a des effets contrastés sur les performances. Des travaux récents montrent que l'utilisation d'une souche de levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* permet de compenser partiellement ou complètement les impacts négatifs de la chaleur sur les performances des animaux. Les objectifs de ce projet sont de valider les effets positifs d'une supplémentation avec des levures vivantes sur les performances des porcs au chaud, vérifier si cet effet est expliqué ou pas par une variation de l'ingéré ou de la fréquence de la distribution des repas et évaluer la contribution des levures aux variations de composition microbiote observées au chaud. Un total de 170 porcs sera utilisé dans deux essais pour mesurer les performances zootechniques, les réponses de thermorégulation, les paramètres sanguins (hormones du métabolisme énergétique et du stress, et des métabolites sanguins), le métabolisme énergétique et la composition du microbiote intestinal. Les effets de la température ambiante, de la supplémentation en levures du régime, du niveau alimentaire et de la fréquence des repas seront étudiés. Règle des 3R. Le remplacement n'est pas possible car l'utilisation d'animaux est inhérente au type d'étude (impact de la supplémentation en levures sur les performances et les réponses physiologiques à la chaleur des porcs charcutiers). 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. Les interventions potentiellement

douloureuses suivront un protocole d'anesthésie analgésie adapté. A la fin de l'étude, 128 porcs seront gardés en vie.

16191 Ce projet cible les encéphalopathies développementales résultant de l'hyper activation de la voie MTORC1 et qui sont caractérisées par épilepsie pharmaco résistante, de troubles neuropsychiatriques, et des malformations du développement cortical. Malgré les progrès diagnostique et génétique intervenus au cours des cinq dernières années, les bases physiopathologiques des manifestations cliniques restent peu élucidées et en conséquence, les patients n'ont recours qu'à des traitements aspécifiques et peu efficaces.

Dans ce projet de recherche, nous étudierons un modèle animal obtenu par transfert de gènes au sein du cerveau embryonnaire grâce à la transfection par électroporation in utero menée chez la rate gestante. Des altérations génétiques focales ainsi générées reproduisent des malformations cérébrales focales observées chez les patients, ce qui n'est pas observé chez des souris transgéniques.

Chez ce modèle pertinent, notre ambition est de mieux comprendre l'organisation et le fonctionnement des réseaux corticaux anormaux, d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires contribuant à l'épileptogenèse et de développer des stratégies thérapeutiques innovantes visant à réduire l'excitabilité neuronale induite par la mutation mTOR.

Ce projet durera 5 ans. Nous utiliserons exclusivement des rats Wistar, au nombre total maximal (embryons compris) de 1544.

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien :

-Concernant la réduction, des expériences précédentes nous ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides pour chacune des procédures expérimentales. Néanmoins, une analyse de puissance statistique est réalisée systématiquement avant chaque expérimentation afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaires pour répondre à la question expérimentale. Une fois les expérimentations réalisées, des tests statistiques appropriés permettront de valider ou non la question initiale posée.

-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'angoisse des animaux. Les animaux seront hébergés en milieu enrichi et au nombre de 3-5 per cage, sauf les animaux opérés qui seront maintenus isolés.

Les animaux seront anesthésiés pour toutes les procédures expérimentales induisant de la douleur. Cette anesthésie sera accompagnée d'une analgésie et d'un suivi post-opératoires appropriés, notamment utilisation d'une fiche de suivi individuelle (voir annexes 1 et 2). Les porteurs du projet possèdent une grande expérience dans ce domaine.

-Concernant le remplacement, notre recherche des mécanismes physiopathologiques à l'origine des crises d'épilepsie nous amène à devoir étudier le développement du cortex cérébral postnatal et adulte. Cette étude ne peut être réalisée que dans des conditions qui préservent l'environnement cellulaire très particulier et complexe de cette structure cérébrale et qui permettent le développement des réseaux neuronaux spécifiques. Aucun modèle de culture cellulaire, même pas les organoïdes cérébraux, ne peut donc remplacer l'animal. Cependant, une partie importante des expériences est effectuée ex-vivo, sur des tranches aigues de cerveau (patch-clamp, imagerie calcique), afin de réduire l'expérimentation sur l'animal vivant. Il est cependant évident que la validation ultime nécessite une évaluation comportementale et électrographique (EEG), surtout concernant l'efficacité antiépileptique des agents pharmacologiques que seront testés.

16192 Les vaisseaux sanguins et lymphatiques forment des réseaux essentiels pour le transport de fluides, de gaz, de macromolécules et de cellules dans l'ensemble du corps. Des dysfonctionnements lors de la formation de ces vaisseaux sanguins et lymphatiques (angiogenèse et lymphangiogenèse) ainsi

qu'au niveau du maintien de l'équilibre des systèmes cardiovasculaire et lymphatique sont la cause de nombreuses pathologies. Des travaux préliminaires chez la souris nous indiquent que l'absence de deux protéines impliquées dans la croissance cellulaire, BMP9 et BMP10, entraîne un défaut de formation des vaisseaux au niveau de la rétine chez les nouveau-nés ainsi que des défauts de la vascularisation pulmonaire et cardiaque chez l'adulte. Notre étude vise à approfondir la compréhension du rôle de ces facteurs de croissance dans la formation des vaisseaux sanguins et dans le maintien du système cardiovasculaire. Ces processus sont complexes et engagent différents acteurs (différents organes, différents types de cellules et autres facteurs de croissance) qui ne peuvent pas être remplacés par un test *in vitro* ou par une étude *in silico*. Le recours à des investigations *in vivo* est donc nécessaire. Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude.

Nous étudierons les effets de la délétion de BMP9 seul, de BMP10 seul et de la double délétion de BMP9 et BMP10 sur le phénotype général des souris : observation, pesées, analyse histologique hématologique et biochimique (paramètres biochimiques sériques courants et dosage de cytokines). Nous étudierons également le réseau vasculaire par des techniques d'imagerie et par des tests fonctionnels (vascularisation d'implants sous-cutanés, perméabilité, mise en évidence de malformations artérioveineuses par injection de latex bleu, hypertension pulmonaire, challenge infectieux, drainage lymphatique...). Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents nous effectuerons des analyses transcritomiques et protéomiques sur les organes et cellules d'intérêt.

Les animaux sont nés et élevés dans un établissement agréé. Leur nombre (980) a été déterminé au minimum nécessaire, sur la base des données de la littérature et pour ne pas compromettre la validité des expériences sur le plan statistique.

Les animaux sont hébergés en groupe et en milieu enrichi de modules permettant d'améliorer leurs conditions de vie. 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. Dans certains cas les animaux sont anesthésiés pour éviter la souffrance et placés sur un tapis chauffant pour maintenir une température adéquate. Un vétérinaire référent visite régulièrement l'animalerie. Des critères d'arrêt sont définis de manière à interrompre une expérience si le bien-être d'un animal semble être compromis.

16193 Un des enjeux de la pharmacopée est de découvrir de nouvelles molécules ou des propriétés insoupçonnées de molécules connues, destinées à soigner l'être humain ou l'animal. Les produits naturels, de par leur incroyable diversité moléculaire, sont des outils pharmacologiques essentiels pour la recherche fondamentale et représentent un réservoir unique de molécules aux vertus potentiellement thérapeutiques. Il n'est donc pas étonnant qu'ils soient à l'origine de plus de 50% des médicaments. Parmi ces produits naturels, les imines cycliques (toxines de micro-algues marines), les venins d'animaux (mollusques, scorpions, serpents, araignées...) et les toxines botuliques (toxines bactériennes) représentent une source originale et, pour certains d'entre eux émergente, de composés bioactifs potentiellement retrouvés dans les médicaments.

Ce projet vise à évaluer, *in vivo*, les mécanismes d'action d'au maximum 45 de ces composés bioactifs sur les propriétés d'excitabilité du système neuromusculaire des animaux, parmi les plusieurs centaines qui auront donné des résultats positifs lors des tests préalables de screening *in vitro*. Le recours à l'animal est ici indispensable car aucun modèle *in vitro* ou *in silico* ne peut aujourd'hui reproduire la complexité du comportement physiologique du système neuromusculaire des mammifères. Le rongeur, de par les similitudes fortes de son système neuromusculaire avec l'Homme, est un modèle permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'Homme.

Le principe pour évaluer *in vivo* les propriétés d'excitabilité neuromusculaire, chez des rongeurs sous anesthésie générale, consiste à stimuler un nerf et à recueillir en retour un signal de son activité électrique. La technique utilisée, très peu invasive pour les animaux, est similaire à un électromyogramme effectué chez l'Homme. En raison de leur spécificité d'action, certains des composés étudiés pourront servir d'outils pour concevoir de nouvelles molécules thérapeutiques. Dans cette optique, des méthodes de détection des sensibilités mécanique et thermique seront ponctuellement utilisées sur un modèle vigile de rongeur.

Le projet prévoit le recours à un minimum nécessaire de 680 rongeurs 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.

Les animaux seront hébergés en groupe, selon les règles en vigueur dans l'animalerie. 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. Bien que les méthodes expérimentales aient été choisies pour éviter toute souffrance aux animaux lors de leur mise en œuvre, des critères ont été définis pour arrêter une expérience si un animal devait souffrir.

16194 Les nouveaux nés et notamment les prématurés sont parfois victimes dans les premières heures de leur vie d'une infection grave causée par la bactérie *Escherichia coli*. L'infection est la conséquence d'un passage spontané de la bactérie du tube digestif vers le sang. En cas de bactériémie importante la bactérie peut passer du sang vers les méninges qui entourent le cerveau, déclenchant une méningite. Notre projet de recherche a pour but de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la bactérie colonise le tube digestif du nouveau né, passe ensuite dans le sang, et franchit la barrière entre le sang et les méninges. Notre travail s'inscrit également dans une démarche d'identification de cibles bactériennes pour l'élaboration d'un vaccin.

Des recherches préliminaires ont identifié un nouveau facteur de virulence (dénommé facteur C ci-après) qui serait indispensable au passage de la barrière sang/méninges. De la colonisation du tube digestif par la bactérie jusqu'à l'envahissement des méninges, les différentes étapes de l'infection néonatale sont complexes et multifactorielles, et ne peuvent être modélisées dans des seules expérimentations *in vitro*. Le recours au modèle animal nous est indispensable pour étudier le facteur C, pour prouver son rôle fondamental dans l'infection, et le considérer ensuite comme une piste vaccinale sérieuse.

Nous utiliserons pour cela 2 modèles animaux. Le premier modèle consiste en des souris adultes infectées par voie intra péritonéale. Ce modèle reconnu de septicémie permettra d'étudier le rôle du facteur C dans la capacité de la bactérie à donner une infection généralisée. Nous utiliserons également des souriceaux âgés de 2 à 3 jours, infectés par voie orale ou par voie péritonéale. Ce modèle nous permettra d'étudier le facteur C dans le contexte plus précis de l'infection néonatale. Il permettra notamment de prouver le rôle du facteur C dans le franchissement de la barrière sang/méninges chez le nouveau-né. Animaux adultes comme souriceaux seront infectés puis sacrifiés au temps le plus précoce avec recueil de différents organes (notamment le cerveau) pour analyser le nombre de bactéries présentes.

Ce projet de 5 ans implique 288 souris adultes et 240 souriceaux, Balb/c de phénotype sauvage.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant de répondre aux questions scientifiques. Nous avons en particulier calculé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats.

Les animaux seront infectés par une souche prototypique sauvage et plusieurs constructions génétiques dérivées. Les souches ont été évaluées et choisies au préalable à partir d'expérimentations *in vitro*, de sorte à n'utiliser chez l'animal que des souches validées, limitant ainsi le nombre d'animaux nécessaire.

Les animaux bénéficieront d'un milieu enrichi (coton, maisons en carton), et d'une surveillance quotidienne durant les procédures expérimentales. Pour limiter toute souffrance, douleur ou stress liés à l'infection, la durée de celle-ci sera réduite au strict minimum permettant de conclure (la plupart des infections ne dureront pas plus de 24h). Des points limites adaptés ont été établis. Ils permettront de sacrifier les animaux de façon plus précoce si nécessaire, pour éviter toute souffrance.

Les résultats attendus de ce travail permettront de mieux comprendre les mécanismes de l'infection néonatale et de la méningite à *E.coli*. Ils permettront également d'identifier une cible vaccinale pour cette infection très sévère.

16195 La lignée des lymphocytes T est primordiale pour aider aux défenses de l'organisme contre les virus et les pathogènes. Une bonne production de lymphocytes T matures compétents est donc nécessaire tout au long de la vie. Chez l'Homme, les leucémies et certains cancers nécessitent de réaliser des greffes de cellules souches de moelle osseuse. Dans ces cas, toutes les lignées sanguines sont produites à partir des cellules souches de la greffe. Cependant, les lymphocytes T ne sont produits que très tardivement (8 mois-1an chez l'Homme)

En conséquence, la recherche des progéniteurs spécialisés dans la génération de cette population représente un enjeu important pour l'amélioration de la reconstitution T et donc l'établissement d'un système immunitaire fonctionnel.

Le but de ce projet est donc d'identifier ces progéniteurs médullaires. Afin de répondre à cette question, nous utiliserons l'expérimentation *in vivo* seule apte à reproduire le plus fidèlement possible ce qui se passe chez l'homme. Une seule procédure sera utilisée, la greffe de cellules par voie intraveineuse dans le sinus rétro-orbital. Pour répondre à notre objectif, plusieurs sous-populations de progéniteurs médullaires seront isolées de la moelle osseuse de souris donneuses issues de notre élevage.

Celles-ci seront greffées à des souris receveuses (souris sauvages ou manipulées génétiquement...) préalablement irradiées, qui seront analysées entre 7 jours et 2 mois post-greffe dans plusieurs organes prélevés en post-mortem. Les séquençages des codes-barres (CB) permettront d'identifier les sous-populations les plus compétentes. Le modèle classique de génération de chimères hématopoïétiques consiste à irradier les souris receveuses pour détruire les lymphocytes et progénitures endogènes qui seront remplacés par les cellules donneuses greffées.

Pour respecter le principe des 3R, nous limitons le plus possible le nombre de souris expérimentales. Par ailleurs, la migration thymique qui sera étudiée ne peut se faire qu'*in vivo*: cela permet de tester les capacités de migration des différents progéniteurs vers le thymus et se rapproche de la physiologie

Dans une stratégie de remplacement, avant la mise en place des études *in vivo*, une étude exhaustive a été réalisée *in vitro* afin de définir les marqueurs à rechercher sur ces progéniteurs.

Pour le raffinement, de l'enrichissement sera disposé dans toutes les cages afin de réduire le stress des animaux

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse des animaux, une surveillance quotidienne sera réalisée en respectant des points limites bien définis entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Pour éviter toute souffrance, toutes les injections par voie intraveineuse se feront sous anesthésie générale.

Un total de 111 souris sur 5 ans, sera utilisé.

L'ensemble de ces travaux devraient permettre d'identifier des progéniteurs médullaires aptes à rapidement migrer vers le thymus et à régénérer la lignée T. Ils seraient ensuite recherchés chez l'Homme.

16196 La douleur chronique neuropathique est un véritable problème de santé publique pour différentes raisons. Elle concerne 8% de la population adulte mondiale et les traitements actuels de référence ne font que masquer la maladie sans pour autant la guérir. Nous avons pu précédemment montrer l'impact du récepteur Flt3 dans la survenue et le maintien des douleurs chroniques de type neuropathique. En effet, l'administration d'un agent pharmacologique antagoniste du récepteur FLT3 prévient l'induction de l'hypersensibilité à la douleur liée à une lésion de nerf périphérique et guérit d'une douleur chronique déjà présente. Suite à cette découverte, le projet se concentre maintenant sur la caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'un certains nombres d'agents pharmacologiques similaires dans un but d'optimisation d'un candidat médicament.

L'efficacité des molécules produites par le laboratoire (famille d'antagoniste FLT3) sera testée sur différents modèles de douleurs neuropathiques ainsi que dans un protocole infectieux pour évaluer les potentiels effets toxiques sur le système immunitaire.

Pour cela, les animaux seront opérés. L'expérimentateur réalisera un acte chirurgical permettant de modéliser la douleur chronique neuropathique (différents modèles seont utilisés) puis testera les différents composés inhibiteurs de FLT3. La nociception sera parallèlement évaluée à l'aide de tests

comportementaux. Le nombre estimé de souris sera de 1352 et de 64 pour les rats. Le nombre de souris par lot a été déterminé sur la base de résultats préliminaires et sur un calcul de puissance.

Afin de répondre à la règle des 3R, le remplacement des animaux seront tout d'abord considéré via l'utilisation de tests *in vitro* (culture cellulaire) qui permettra de sélectionner les meilleures molécules. Une fois les meilleures molécules identifiées, les tests *in vivo* seront réalisés. Dans un souci de limiter le nombre d'animaux, une habitude de minimum une semaine est réalisée au cours de laquelle les animaux sont placés dans la pièce expérimentale pendant minimum 1h puis exposés aux différents tests sans appliquer de stimulus nociceptif. Cela permet aux animaux de s'habituer à l'environnement ainsi qu'à l'expérimentateur ce qui limite l'impact du stress lié à la procédure expérimentale. Cette période d'habitude est fondamentale afin d'assurer une reproductibilité des tests nociceptifs, de limiter angoisse et stress des animaux assurant alors une meilleure homogénéité dans les différents lots expérimentaux. Ceci nous permet donc également de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, les animaux sont stabulés en cage collective (2 animaux/cage pour les rats ou 10 animaux/cage pour les souris) dans une animalerie dans laquelle la température et l'hygrométrie sont contrôlées. Les locaux sont en légères sur-pression, les cages possèdent des couvercles filtrants, les animaux bénéficient d'un enrichissement du milieu (copeaux, igloos en plastique, bâtonnets de cellulose). Concernant les points limites, en cas de troubles comportementaux (perte de poids rapide supérieure à 15%, paralysie des membres postérieures, pilo-érection) suite à une injection IT ou icv, les animaux seront euthanasiés sans délai afin d'éviter la mort par inanition.

16197 La circulation cérébrale présente des propriétés particulières : elle forme une barrière limitant les échanges entre le sang (la barrière hématoencéphalique ou BHE) et le cerveau et elle dispose d'un mécanisme original de régulation du flux cérébral sanguin (la réactivité vasculaire) pour répondre aux besoins énergétiques des neurones (ce mécanisme s'appelle l'hyperémie fonctionnelle). Ces propriétés particulières sont en partie dues à la complexité des interactions existant entre les différentes cellules du cerveau. Les altérations de la BHE sont actuellement suspectées d'accélérer voire déclencher la démence sénile et sa fonction de filtre hautement sélectif limite parfois le passage des médicaments devant agir à l'intérieur du cerveau.

Le but du projet est d'évaluer *in vivo* l'efficacité de la BHE et la réactivité vasculaire dans une seule expérience chez l'animal et de tester les effets potentiels de composés pharmacologiques d'intérêt pour ralentir l'apparition de troubles de la mémoire.

La BHE peut être en partie étudiée sur des modèles de reconstitution *in vitro*. Mais ces modèles, s'ils peuvent prédire le maintien des fonctions de barrière entre les deux faces d'une couche de cellules endothéliales, ils ne peuvent pas prédire les détériorations de la BHE induites dans des modèles de pathologies et de leurs effets sur les fonctions du cerveau comme la mémoire. De même il n'est pas possible de mesurer *in vitro* le dialogue entre les cellules du cerveau qui régule la réactivité vasculaire. Il n'est pas possible de REMPLACER la totalité des expériences *in vivo* par des expériences *in vitro*. Par exemple, il n'est pas possible de reproduire *in vitro* la pressurisation du réseau vasculaire. Enfin, toutes les hypothèses validées *in vitro* doivent être testées *in vivo* sur l'animal entier avant une application chez l'Humain parce que l'hyperémie fonctionnelle ne peut être étudiée qu'*in vivo*. Les protocoles classiques pour mesurer l'efficacité de la BHE consiste à injecter à l'animal un traceur de taille moléculaire connu et d'évaluer son transfert dans le parenchyme cérébral par un dosage post-mortem. Ils sont très consommateurs d'animaux. Mais depuis quelques années des méthodes telle que l'endomicroscopie *in vivo* couplée à la fluorescence ont été développées et permettent d'étudier les réseaux vasculaires à l'échelle des capillaires. Enfin, au niveau cérébral, elles permettent de mesurer dans une seule expérience et en temps réel l'efficacité de la BHE et la réactivité vasculaire. Cette technique aboutit donc à REDUIRE le nombre d'animaux pour ce genre d'étude. Le traceur est choisi pour être non toxique et éliminable par les voies naturelles afin de conserver en vie l'animal pour réaliser un suivi longitudinal beaucoup plus pertinent pour suivre l'évolution temporelle des altérations possible de ces processus dans les maladies neurogénératives. Ce suivi longitudinal s'il REDUIT le nombre d'animaux utilisés, permet également de RAFFINER les protocoles expérimentaux puisque chaque animal pouvant être suivi dans le temps, il est son propre contrôle ce qui renforce le pouvoir de l'analyse statistique. Le bien-être et la santé des animaux seront suivis quotidiennement dès leur inclusion dans

le protocole selon une grille détaillée mentionnant des paramètres physiologiques et la qualité des interactions avec les expérimentateurs. La possibilité de coupler ce type d'étude à des analyses comportementales permettra à terme d'accroître le niveau de RAFFINEMENT de ce type de protocoles. L'expérience proposée dans cette saisine sera réalisée sur des rats afin de caractériser l'activité d'un composé pharmacologique dont on suspecte une activité sur l'efficacité de la BHE et/ou la réactivité vasculaire cérébrale qui pourrait rendre compte de son action sur la mémoire. Cette étude nécessitera au total 150 rats.

16198 A l'heure actuelle, on constate que la plupart des pathologies ont une incidence et une progression qui dépend du sexe du patient, or nos connaissances des réseaux génétiques qui contrôlent la différenciation sexuelle sont encore fragmentées. Les mutations pathogènes ou régulation anormale des gènes de la détermination du sexe donnent lieu à des DSD (différences/troubles du développement du sexe). Les DSD sont un groupe complexe de rares conditions congénitales avec des phénotypes affectant les systèmes endocrinien et reproducteur d'individus d'âge différent : l'inversion complète du sexe est diagnostiquée chez le nouveau-né avec des organes génitaux atypiques et l'aménorrhée primaire, signe d'anomalies ovariennes, affecte des individus post-pubères. La complexité des phénotypes DSD se reflète par la variation des étiologies génétiques et les causes de ces pathologies sont encore inconnues dans 50% des cas. Il est important de mieux connaître les bases moléculaires de ces pathologies dans le but d'anticiper les conséquences et de conseiller les familles des enfants atteints par des DSD. C'est d'autant plus important que ces mécanismes pourraient être également impliqués dans les différences sexuelles de diverses maladies.

Le suppresseur de tumeur WT1 est essentiel à la détermination du sexe, mais on ignore son mécanisme de régulation. Or il est vraisemblable que les gènes contrôlant l'expression de Wt1 sont eux-mêmes des acteurs clés de la détermination du sexe. On vient d'identifier le mécanisme de régulation de Wt1 dans la différenciation de la gonade embryonnaire, futur testicule ou ovaire. Nous proposons d'étudier l'impact des mutations de ces gènes dans le développement sexuel de l'individu. L'ensemble de ce projet utilise une procédure simple d'administration de tamoxifène afin "d'éteindre" ou "d'allumer" l'expression des gènes d'intérêt en ciblant un type de cellules donné à un moment choisi du développement, ce qui n'affectera que très faiblement la qualité de vie des animaux. En effet, les souris utilisées pour générer les embryons ne présenteront pas de phénotype dommageable et les embryons dans lesquels la mutation sera induite seront sacrifiés avant la naissance.

Ce projet a été élaboré et sera réalisé dans le respect de la règle des 3R (remplacer, raffiner, réduire)

1) le recours à l'expérimentation animale est essentiel pour la biologie du développement et l'étiologie de la différenciation sexuelle ("remplacer") : en effet, les techniques de culture cellulaire ne permettent pas d'appréhender le développement gonadique qui nécessite vascularisation et contexte tridimensionnel et ont montré leurs limites en aboutissant à des résultats erronés. Cependant si de nouvelles conditions de culture satisfaisantes sont élaborées, nous les utiliserons dans la perspective de remplacement.

2) les animaux seront hébergés par deux ou par trois dans des cages comportant des objets à ronger et des igloos pour se faire un nid de façon à garantir leur bien-être et leur permettre d'exercer les activités spécifiques à leur espèce. ("raffiner").

3) nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés. Le nombre minimal d'animaux nécessaires sera utilisé tout en conservant la pertinence des données statistiques, soit 734 souris (334 femelles gestantes et 400 embryons de stade de développement postérieur au 2ème tiers de la gestation) ("réduire"). Ce travail permettra de mieux comprendre les processus régulant les différences sexuelles, de proposer de nouveaux diagnostics aux patients et des solutions thérapeutiques appropriées.

16199 Le Ministère de l'Agriculture a demandé aux équipes de recherche zootechnique de ne plus utiliser d'animaux fistulés au plus tard en 2025. Les ruminants fistulés (vaches essentiellement, mais aussi moutons et chèvres, pour lesquels un acte chirurgical vétérinaire a permis de positionner de façon permanente au niveau du flanc gauche une canule donnant accès à leur rumen) sont présents depuis plusieurs décennies dans la plupart des universités et instituts de recherche zootechnique français et

étrangers. Ils permettent d'évaluer les ressources alimentaires et d'étudier l'impact du microbiote digestif sur l'efficacité digestive, la santé, le bien-être, les rejets de méthane et d'azote dans l'environnement et la qualité des produits animaux. Ils sont utilisés dans des procédures de prélèvement pour quantifier les processus digestifs ou pour disposer d'inoculum (échantillon de contenu ruminal) dans des essais *in vitro*. La pose de canule permanente du rumen reste à ce jour la pratique de référence pour accéder au microbiote ruminal.

Les enjeux découlant de la demande ministérielle sont, entre autres :

1) de mettre en place de nouvelles méthodes de laboratoire (enzymatiques, fermenteurs) pour prédire les valeurs nutritionnelles des aliments. La méthode "in sacco" en animal fistulé est actuellement la référence. Celle-ci consiste à introduire dans le rumen par la canule de petits sachets en toile de nylon contenant un aliment qui sera ainsi soumis à l'action des microbes du rumen durant plusieurs heures, ensuite à retirer le sachet puis peser et analyser les résidus d'aliment qu'il contient pour déterminer l'aptitude de cet aliment à être dégradé par l'animal. Au sein de notre unité de recherche, plusieurs scientifiques ont une expertise reconnue dans le domaine de l'étude du métabolisme microbien dans le rumen en fermenteur et projettent de valider un modèle de fermenteur innovant par sa capacité à être inoculé par des sources de microbiote ruminal obtenues sans prélèvement par une canule. Ce fermenteur permettra de quantifier les différentes activités métaboliques du microbiote ruminal dans des conditions expérimentales contrôlées.

2) d'établir les modalités de conservation de contenus de rumen, à l'avenir prélevés en abattoir, permettant leur emploi en tant qu'inoculum sur des périodes de plusieurs mois, en particulier pour démarrer des fermenteurs nécessitant du contenu ruminal riche en phase solide. Un criblage de différentes méthodes de conservation sera entrepris pour évaluer leur capacité à préserver l'intégrité fonctionnelle et compositionnelle de l'inoculum.

Le projet aura donc trois objectifs principaux :

1) valider la méthode d'obtention de contenu ruminal par voie oesophagienne pour ensemer un nouveau système de fermenteurs. Cet objectif nécessite l'emploi de chèvres fistulées.

2) tester différentes modalités de conservation de l'inoculum ruminal. Cet objectif est à mener de préférence avec des chèvres fistulées.

3) caractériser les capacités expérimentales de ces fermenteurs sur des critères fonctionnels et relevant de l'écologie microbienne. Cet objectif peut être mené avec les chèvres conventionnelles (sans canule).

Le nombre maximal d'animaux utilisés dans le projet est de 10 chèvres dont 2 chèvres déjà porteuses de canule du rumen et 8 chèvres conventionnelles.

Ce nombre a été réduit au strict minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement interprétables et prendre en compte la variabilité entre animaux. Le projet ne demande pas de nouvelle intervention chirurgicale parce qu'il valorise des animaux précédemment canulés. La règle du raffinement a été prise en compte en hébergeant les animaux en lot sur aire paillée selon les pratiques d'élevage habituelles (pierre à sel). Les prélèvements par sonde œsophagienne seront réalisés par un personnel expérimenté formé et habilité afin de ne pas provoquer de blessure, et d'éviter toute douleur ou stress supérieurs à ceux provoqués par le prélèvement en lui-même. Une baisse de poids sans récupération associée ou non à d'autres signes, entre autres apathie et baisse d'ingestion, sera un des principaux points limites. Dans le présent projet, la règle du remplacement a été prise en compte en distinguant clairement les objectifs qui ne peuvent être atteints sans recourir aux animaux fistulés de ceux qui n'en nécessitent pas. De plus, la validation de la méthode de prélèvement par sonde permettra de s'affranchir, dans le futur, de l'utilisation d'animaux porteurs de canule du rumen. Dans le cadre du projet et sous réserve d'autorisation à expérimenter, les essais mobilisant des chèvres fistulées sont planifiés durant 8 mois à partir du début de l'autorisation à expérimenter. Les autres essais seront réalisés en 3 ans au plus à partir du début de l'autorisation à expérimenter et serviront à obtenir les données et observations nécessaires pour atteindre les objectifs du projet dans une démarche expérimentale séquentielle.

16200 Notre modèle murin de troubles neuro-développementaux est caractérisé par des comportements sociaux et émotionnels inadaptés (apparition de troubles anxieux et dépressifs) ainsi que des déficits dans certains processus cognitifs. Nos expériences visent à évaluer l'efficacité d'une molécule pour améliorer ces déficits. L'utilisation de modèles animaux est nécessaire comme premier test, car le travail sur les animaux fournira une méthodologie simple et rapide pouvant ensuite être traduite pour les patients. Nous envisageons donc d'analyser les conséquences comportementales de cette molécule. Lorsque l'on veut étudier les troubles comportementaux liés à des perturbations neuro-développementaux et les facteurs pharmacologiques susceptibles de les atténuer, il n'y a pas de solution de remplacement à l'utilisation des animaux. Néanmoins, afin de réduire le nombre d'animaux, les différents tests comportementaux sont réalisés sur les mêmes souris, espacés de 24h au moins et toujours dans le même ordre afin de rendre les différentes expériences comparables. Etant donné la variabilité interindividuelle existant dans le comportement des souris, un effectif par groupe de 12 animaux est nécessaire. Pour évaluer la molécule, nous envisageons d'évaluer d'abord les effets d'un traitement aigu. Il sera nécessaire d'utiliser 4 groupes (3 doses plus contrôles) pour chacun des deux génotypes (modèle et wild-type) soit 96 souris par âge (2 âges, adolescent et adulte) donc 192 souris en totale car il est nécessaire d'utiliser de groupes indépendantes pour chaque âge. Les tests comportementaux seront réalisés en 2 lots : un pour les tests sociaux et un pour les tests émotionnels et cognitifs pour les 2 âges donc nous avons besoin de tester $2 \times 192 = 384$ souris. Pour les tests de comportements sociaux, 20 souris NMRI seront nécessaires en tant qu'animal stimulus, donc cette première expérience nécessite 404 souris. Si les résultats sont prometteurs, nous envisagerons de faire la même expérience pour évaluer les effets d'un traitement sub-chronique, comme ça sera nécessaire pour traiter les patients humains. Afin de limiter au maximum le stress des animaux, une habituation à l'expérimentateur par manipulation quotidienne légère est réalisée. Un seul expérimentateur manipule les animaux pendant toute la durée de l'expérience. Aucun des tests comportementaux n'est invasif, douloureux ou ne nécessite de privation alimentaire ou hydrique. Les animaux sont habitués à la pièce expérimentale et au dispositif. Tout ceci diminue le stress des animaux et améliore la fiabilité des tests comportementaux. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été défini d'un point de vue statistique afin de réduire au maximum leur nombre. Le remplacement de l'utilisation des animaux n'est pas possible vue la nécessité des tester les effets pharmacologiques *in vivo* pour pouvoir évaluer la validité du traitement proposé pour l'application dans le domaine clinique. 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 toute douleur, souffrance, angoisse et dommage susceptible d'être infligé à ceux-ci.

16201 Outre les impacts sanitaires, la prolifération des rongeurs nuisibles est à l'origine de détériorations matérielles majeures en particulier par attaque des câbles électriques et électroniques. De nombreux exemples peuvent étayer ces propos. Ainsi, les compagnies d'assurance américaines estiment qu'environ 25% des feux dont la cause est inconnue sont dus aux rongeurs par grignotage des câbles électriques. Parmi les rongeurs, le rat (rat noir ou rat brun) et la souris sont les espèces les plus problématiques. Ils rongent en milieu naturel les câbles électriques, téléphoniques, informatiques et optiques.

L'objectif de ce projet est de tester la capacité de câbles ou autres matériaux à résister aux rongements des rongeurs en milieu naturel car les rongeurs utilisent ces matériaux pour construire leurs nichages. La preuve de la résistance des câbles aux rongeurs sera obtenue par des essais menés en conditions semi-naturelles, dit essai « semi-field ». Un essai « semi-field » simule les conditions de terrain dans des conditions de laboratoire contrôlées. Le comportement des rongeurs lié à la recherche de nourriture et de matériel nécessaire à la nidification est responsable des dégâts occasionnés aux câbles et autres matériaux. Seul l'expérimentation sur rongeurs permettra de démontrer la résistance de ces matériaux. Ces rongeurs devront être à phénotype sauvage, les souches de laboratoire ne présentant pas le même comportement que les souches à phénotype sauvage. Le comportement des rongeurs lié à la recherche de nourriture et de matériel nécessaire à la nidification est en grande partie social. Par conséquent, la condition de terrain la plus importante à simuler est la présence de congénères. Les matériaux dont la résistance est à tester seront mis en présence de rongeurs à phénotype sauvage

pendant une durée longue de 1 à 2 mois, ces matériaux devant démontrer une résistance sur des durées de plusieurs années voire plusieurs dizaines d'années. Une inspection quotidienne des matériaux sera effectuée pour visualiser leur résistance. Ces matériaux seront considérés comme de l'enrichissement de leur environnement.

Nous réduirons au maximum le nombre d'animaux en expérimentation. Un minimum de 10 animaux par groupe sera requis pour exercer une pression sur les matériaux à tester. C'est donc le nombre d'animaux minimum nécessaire pour obtenir le résultat, ce nombre pourra être doublé si la pression doit être plus forte. Sur 5 ans, nous envisageons d'utiliser 1050 rongeurs (pour permettre d'évaluer la résistance de 5 types de câbles par an).

Nous raffinerons la méthodologie effectuée, ce qui implique la notion de points limites.

Si certains animaux se blessaient au cours de l'étude (en raison de problèmes de dominance ou d'un contact excessif avec le dispositif à tester) ou présentaient des signes de prostration, les animaux seraient euthanasiés. Le raffinement implique également l'amélioration des conditions de vie des animaux. L'essai semi-field sera réalisé dans des terrariums extérieurs abrités de la pluie offrant un espace minimum $\geq 0,5 \text{ m}^2$ par rat et $0,25 \text{ m}^2$ par souris, enrichi avec des branches, des abris, des tunnels, du matériel de construction de nid. Les animaux auront de la nourriture et de l'eau ad libitum. L'enrichissement du terrarium sera conçu de manière à ce que l'inspection quotidienne des rongeurs et des câbles ainsi que l'approvisionnement en alimentation et en eau ne causent que des perturbations minimales dans leur environnement. Les essais seront conduits en dehors des périodes de grand froid et de forte chaleur. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et qualifié afin de limiter au maximum le stress causé par les tests.

16202 Les gliomes et en particulier les glioblastomes sont les cancers cérébraux les plus fréquents et les plus graves chez l'adulte. Le pronostic des patients est le plus souvent réservé malgré des traitements lourds (i.e. chirurgie, radiothérapie et, chimiothérapie cytotoxique). De nouveaux traitements sont donc nécessaires.

Compte tenu du nombre de traitements innovants actuellement en développement dans les laboratoires académiques et industriels, ces derniers ne pourront pas tous être évalués rapidement dans le cadre d'essais cliniques chez l'Homme.

Il apparaît donc important d'accélérer l'évaluation et la hiérarchisation de ces traitements innovants prometteurs, en laboratoire, pour en faire bénéficier, dans le cadre d'essais cliniques, les patients souffrant de tumeur cérébrale maligne.

Pour sélectionner les molécules les plus efficaces le plus rapidement possible l'équipe GlioTEX (acronyme de Glioblastome et Thérapies Expérimentales) développe et caractérise des lignées cellulaires de glioblastome dérivé de patient (PDCL) *in vitro* et des modèles murins de glioblastome (xénogreffes hétéro ou orthotopiques de PDCL dans des modèles murins).

Les modèles animaux xénogreffés avec des cellules de tumeurs cérébrales humaines sont des modèles appropriés complétant de manière pertinente les modèles cellulaires *in vitro* pour sélectionner les traitements innovants les plus prometteurs. En effet, les modèles murins permettent d'étudier l'efficacité des traitements innovants sur des cellules tumorales cérébrales placées dans un micro/macroenvironnement (sous-cutané ou cérébral) récapitulant au plus près celui observé chez l'Homme. Cet environnement (i.e. système vasculaire, système immunitaire, barrière hématoencéphalique) joue un rôle clé dans le développement des cellules tumorales et n'est pas parfaitement modélisable *in vitro*.

Les efforts fournis afin de réduire, raffiner et remplacer sont :

- (i) seuls les composés efficaces *in vitro* par rapport aux traitements standards, seront testés *in vivo*,
- (ii) les cellules tumorales cérébrales greffées chez l'animal sont transduites par le gène de la luciférase permettant de suivre le développement tumoral, cela évite le sacrifice séquentiel d'animaux et réduit donc le nombre d'animaux utilisé
- (iii) la bioluminescence permet également de suivre l'efficacité des traitements testés en temps réel ce qui apporte une information supplémentaire à la survie.

(iv) une étude statistique détermine le nombre d'animaux nécessaire minimum pour atteindre un niveau de significativité acceptable. Cela permet de limiter le nombre d'animaux et d'éviter les études ne permettant pas de répondre à une question posée par manque de puissance statistique,

(v) les animaux sont suivis quotidiennement et des points limites sont mis en place pour éviter au maximum la souffrance subie.

(vi) des analgésiques adaptés sont utilisés dès qu'une chirurgie est effectuée (en pré et post opératoire) pour réduire l'inconfort, la douleur et le stress.

Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet seront pour la majorité immunodéprimés (Souris/ Rat athymics ou SCID) car cela est nécessaire pour permettre la greffe de PDCL humaines. Ils peuvent également être immunocompétents (souris C57BL/6) dans le cas d'étude de molécules ayant un effet sur l'immunité, les lignées cellulaires tumorales utilisées dans ce cas seront donc murines.

Le nombre d'animaux prévu pour les 5 ans de ce projet est au maximum 2464 souris et 170 rats. Ce qui nous permettra, par an de tester entre autres 7 molécules thérapeutiques seules ou en combinaison chez la souris, 1 molécule chez le rat et de caractériser la tumorigénicité chez l'animal de 15 PDCL.

16203 Le cancer colorectal représente un problème majeur de santé publique et touche près de 45 000 personnes en France. C'est la deuxième cause de décès par cancer avec près de 18 000 décès par an. Bien que la chirurgie constitue le traitement de base du cancer colorectal, la chimiothérapie et les thérapies ciblées sont souvent nécessaires après la chirurgie dans le but de réduire le risque de récurrence. Toutefois, ces traitements se montrent parfois inefficaces. Il apparaît donc essentiel de mieux analyser les différents événements moléculaires et cellulaires intervenant tout au long du processus tumoral intestinal afin d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques. L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de la reprogrammation métabolique dans le contrôle de la tumorigénèse intestinale. Nous faisons l'hypothèse qu'en agissant sur le métabolisme énergétique et en limitant la reprogrammation métabolique des cellules tumorales, la prolifération tumorale pourrait être ralentie ou bien stoppée. Dans le cadre de cette étude, nous nous attacherons à : 1) définir l'impact d'une modulation du métabolisme énergétique cellulaire sur l'initiation et la progression du cancer en ciblant directement la cellule tumorale ou les cellules de son micro-environnement (cellules immunitaires connues pour influencer le développement tumoral); 2) déterminer le potentiel thérapeutique d'agents pharmacologiques dans le contexte du cancer colorectal. Seule une approche intégrée par l'expérimentation animale, mimant le développement du cancer colorectal, est envisageable en raison de la complexité des relations entre les différents types cellulaires existant au sein d'une tumeur et ne peut être remplacée par des analyses *in vitro*. Nos travaux reposent sur la caractérisation de modèles murins génétiquement modifiés. Le nombre de souris utilisées sera de 1080 sur 5 ans. Nous analyserons l'impact d'une part de la délétion génique et d'autre part de l'activation pharmacologique d'un régulateur clé du métabolisme énergétique cellulaire sur la tumorigénèse colique dans 2 modèles de cancer colorectal chez la souris. Un modèle de carcinogénèse chimique pour étudier son rôle dans l'initiation du processus tumoral, et un modèle génétique inductible par le tamoxifène afin d'étudier son rôle dans la progression tumorale. Nos procédures expérimentales correspondent à l'induction d'un cancer colorectal par injection d'un produit tumorigène ou par suppression génétique de l'expression d'un suppresseur de tumeur, ensuite au traitement par voie orale avec différentes molécules pharmacologiques pour évaluer leur potentiel thérapeutique sur le développement tumoral. Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, une surveillance permanente sera effectuée et intensifiée pendant les phases potentiellement délétères, en respectant des points limites définis permettant d'anticiper la mort de l'animal en cas de souffrance. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de limiter le nombre d'animaux nécessaires tout en s'assurant de la reproductibilité et d'une analyse statistique efficace des résultats. L'élevage des souris sera en adéquation avec le nombre minimal requis. Pour réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, nous utiliserons des techniques non invasives comme l'imagerie par échographie et la coloscopie qui permettent un suivi longitudinal du développement de la tumorigénèse colique. Cette approche méthodologique nous permet de faire des études sur des tumeurs de petites tailles, à des stades précoces, ce qui évite la souffrance engendrée par un développement tumoral important. Une veille scientifique continue sera effectuée évitant ainsi toute expérimentation déjà rapportée dans la

littérature. A terme, les résultats de ce projet permettront le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir et traiter le cancer colorectal.

16204 Les modèles animaux sont essentiels dans l'étude des maladies humaines et en particulier dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les avancées scientifiques de la recherche en immunologie engrangées au fil des décennies ont permis d'appréhender dans le détail les étapes du développement des cellules hématopoïétiques humaines, des leucocytes, les rôles respectifs des différentes sous-populations lymphocytaires, les mécanismes orchestrant la régulation de l'immunité, ainsi qu'un grand nombre de pathologies humaines. Cependant, malgré l'existence de méthodes relativement sophistiquées, l'étude *in vitro* du système immunitaire humain reste malheureusement limitée par de nombreux obstacles techniques. Le recours aux modèles animaux, en l'occurrence murin, est donc indispensable pour compléter les études et le développement de stratégies thérapeutiques influencées par le système immunitaire.

Toutefois, des différences notables existent entre les systèmes immunitaires des espèces humaine et murine. De plus, la co-évolution des pathogènes humains avec leur hôte induit un tropisme marqué – voire exclusif – pour l'espèce humaine (exemple de maladies infectieuses particulièrement dévastatrices telles que les virus de l'immunodéficience humaine, de l'hépatite B et C, ou encore le Plasmodium), accentuant d'autant plus le manque de modèles animaux totalement représentatifs de certains mécanismes ou pathologies chez l'Homme.

La pertinence d'un modèle animal en recherche biomédicale, c'est-à-dire sa capacité à permettre de comprendre, de reproduire ou de prédire l'évolution ou l'impact d'un phénomène étudié (molécule, maladie...) chez l'homme est donc devenu un enjeu majeur à la fois de santé humaine et d'éthique animale (3R). Il existe de fait, un besoin pressant pour de nouveaux modèles expérimentaux spécifiquement adaptés à la recherche en immunologie humaine.

Dans ce contexte, les souris humanisées, exprimant un système immunitaire humain suite à l'implantation de cellules hématopoïétiques humaines, sont des modèles extraordinairement pertinents pour l'étude *in vivo* du développement, des mécanismes et de la fonction du système immunitaire humain, que ce soit pour la recherche fondamentale, des études pré-cliniques ou des applications bio-industrielles.

Ces modèles permettront notamment d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, de définir les biomarqueurs des pathologies extrapolables dans de nombreux domaines chez l'homme tels que l'hématopoïèse, les maladies infectieuses, l'immunologie, l'oncologie... et de comprendre les mécanismes fondamentaux de différentes pathologies.

Après humanisation et réalisation des analyses nécessaires pour s'assurer que le degré d'humanisation attendu est atteint, les animaux « prêts » pour les applications ultérieures seront expédiés aux utilisateurs finaux.

La règle des 3R sera appliquée dans le présent projet pour les principes de réduction et de raffinement : nous produirons et distribuerons des modèles de souris dont le système immunitaire est humanisé ('raffinement'), tout en maîtrisant au plus près les volumes de production de ces souris ('réduction'), en fonction des besoins de recherches exprimés ou pressentis chez nos clients. Le nombre d'animaux sera donc calculé selon ces besoins. Ainsi, selon nos estimations, nous prévoyons d'utiliser 1000 souris par an pour ce projet, soit 5000 souris sur 5 ans.

Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique dans les cages (matériel de nidification et bâtons de bois à ronger), de l'aliment à volonté, de l'eau à volonté et un personnel habilité qui 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 est réalisée quotidiennement suivant notre grille interne d'évaluation de la douleur et de la souffrance animale (exemple de critères observés/renseignés: posture indicatrice de souffrance ; texture de poil non soignée ; activité réduite ; perte de poids) pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera mis à mort selon une méthode

recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal.

Le degré de gravité de procédure associé à ce projet est de niveau « modéré ».

16205 Le cancer bronchique est le 3ème cancer le plus fréquent et la première cause de décès par cancer dans le monde.

Les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules (CBPNC), le plus fréquent (85%) des cancers bronchiques, présentent plusieurs anomalies moléculaires récurrentes dont la perte d'expression du gène suppresseur de tumeur RASSF1A. Cet événement fréquent (25% des CBNPC) est un facteur de mauvais pronostic : la médiane de survie globale des patients présentant cette anomalie moléculaire est divisée par un facteur 3 comparée aux autres patients. RASSF1A régule les kinases de la voie Hippo. Nous suspectons qu'en l'absence de RASSF1A, les kinases Hippo sont dérégulées et engendrent des désordres cellulaires à l'origine de l'agressivité des cellules tumorales bronchiques n'exprimant pas RASSF1A. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus *in vitro* étayaient cette hypothèse : en inhibant les kinases Hippo, nous parvenons à diminuer l'agressivité des cellules tumorales bronchiques n'exprimant plus RASSF1A. Pour être pleinement validée, notre hypothèse doit également être testée *in vivo*. Nous souhaitons ainsi confirmer que les kinases NDR sont à l'origine de la carcinogenèse bronchique des patients présentant une perte d'expression de RASSF1A, en étudiant les conséquences de l'invalidation de ces kinases dans la prise de xénogreffe et la formation de métastases de cellules de lignées tumorales bronchiques humaines chez des souris immunodéprimées SCID beige. 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. Ce projet s'inscrit dans les thématiques du laboratoire, validées par le comité d'expert HCERES.

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). Cette étude s'appuie en outre sur notre expertise des modèles tumoraux de tumeurs bronchiques sur les Animaux SCID Beige ayant montré que 10 animaux par groupe sont nécessaires afin d'escompter obtenir des résultats significatifs, et ainsi comparer les effets de l'expression ou non des kinases Hippo sur la prise de xénogreffes et /ou la capacité des cellules tumorales à former des métastases. Pour cette étude, 120 animaux seront nécessaires puisque nous souhaitons travailler avec 3 modèles cellulaires (HBEC-3, H1299 et A549) de 4 statuts génétiques distincts (Témoin, shControl, shNDR1, shNDR2) et des groupes de 10 animaux par condition ($3 \times 4 = 12$ lots de 10 animaux, soit 120 animaux au total). Le bien-être animal est au cœur du protocole : l'intégrité physique de chaque animal sera suivie quotidiennement, et la croissance de la xénogreffe mesurée tous les 2-3 jours à l'aide d'un pied à coulisse 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 son pelage présente un mauvais aspect, si l'animal présente une baisse de la température corporelle, s'il émet des vocalises et/ou s'il convulse, et enfin si sa xénogreffe excède un volume $> 1000 \text{ mm}^3$ et devient alors un frein à sa motricité et qualité de vie. Si l'un de ces critères apparaît ou au terme de l'expérience, l'animal sera euthanasié : Une injection sous-cutanée de buprénorphine (Buprécare® 0.1 mg/kg, s.c.) est initialement réalisée pour assurer une bonne analgésie de l'animal, ce médicament a été choisi car il ne présente pas de risque de dépression respiratoire. Puis 30 minutes après l'injection de buprénorphine, une anesthésie sous-léthale profonde est entraînée par l'inhalation par l'animal d'isoflurane volatile (5% apporté dans un mélange O₂/N₂O (30%/70%)), procédure d'anesthésie couramment utilisée dans les recherches précliniques car connue pour présenter une excellente qualité d'anesthésie avec un effet immédiat, tout en contrôlant la profondeur et la durée de l'anesthésie. La mort de l'animal, anesthésié par isoflurane pendant toute la procédure de mise à mort, est provoquée par perfusion intracardiaque de sérum physiologique, cette perfusion permettra ultérieurement d'administrer le PFA (paraformaldéhyde), composé préservant les organes de l'animal. Après vérification d'absence de réflexe podal et de réponse au stimulus du pincement de l'une des pattes arrière, la mort de l'animal sera confirmée par dislocation cervicale. Une thoracotomie

post-mortem sera alors réalisée pour prélever les poumons et le foie, puis l'animal sera décapité afin de prélever le cerveau pour analyses histologiques.

Tout au long de l'expérience, le confort/bien-être des animaux sera suivi quotidiennement les jours ouvrés, les weekends et jours fériés par du personnel formé. L'intégrité 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. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés de la naissance à la mort de l'animal.

16206 Dans le but d'évaluer le potentiel thérapeutique d'anticorps monoclonaux sur l'effet greffon contre l'hôte (GvHD) et d'en sélectionner le meilleur, nous testons *in vivo* ces candidats médicamenteux en modèle dans un modèle de greffe contre l'hôte (GVHD) xénogénique sur des souris NSG. Ce modèle sera induit par injection de cellules mononuclées de sang périphérique xénoréactives (PBMC)

Ces anticorps monoclonaux ciblent un récepteur membranaire exprimé sur les leucocytes humains. Il a été démontré que ce récepteur est un marqueur des lymphocytes T activés et aussi associé aux pathologies inflammatoires. Ces anticorps ont été générés et validés *in vitro*. Ces différents tests ont permis de sélectionner 2 candidats, mais des tests *in vivo* sont nécessaires. Pour pouvoir envisager des essais cliniques nous devons tester ces anticorps dans des modèles *in vivo* dans le contexte d'une GvHD qui fait l'objet de cette étude.

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 immuno-régulatrice de la molécule dans un modèle *in 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 est réduit à 26, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Les souris seront divisées en 4 groupes (26 souris/groupe). Le groupe témoin recevra un isotype contrôle, les autres groupes seront traités avec des anticorps humains. Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total des animaux est de 104.

- Raffiner : A partir de J0, les souris seront surveillées quotidiennement pour leur poids ainsi que le score clinique, 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 (cf fichier annexe). Les conditions d'hébergement et d'enrichissement sont standards à l'espèce, les souris seront par groupe social de 5 maximum par cage ventilée sur un portoir à l'animalerie, avec des moyens d'enrichissement (des tunnels, et des bouts de papiers).

Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids et le score clinique pour diagnostiquer le développement de la GVHD. Des prélèvements sanguins seront effectués une fois tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec les molécules et ceux du groupe contrôle 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 GVHD, et par immuno-histologie pour étudier les conséquences de la migration des cellules injectées. Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des anticorps testés sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVHD et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées versus souris contrôles

16207 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 diagnostique 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 (β^- ou α), 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 radioisotopes sont également dénommées radiotraceurs. Un radiotraceur est ainsi composé d'un radioisotope qui peut avoir diverses utilités (diagnostic, thérapie), d'une molécule d'intérêt qui va se fixer sur un récepteur particulier (récepteur présent sur les cellules tumorales par exemple), et la plupart du temps d'un chélate qui va permettre de lier la molécule d'intérêt avec le radioisotope en question. Les principaux radioisotopes étudiés pour le développement de molécules théranostiques sont le Technétium-99m et le Gallium-68 pour le diagnostic, et le Lutétium-177 pour la thérapie. L'idéal serait de trouver un chélate qui permette de bien lier la molécule d'intérêt à un radioisotope optimal pour l'imagerie et également à un radioisotope permettant la thérapie comme le Lu-177. Le premier objectif de ce travail est d'évaluer la biodistribution d'un certain nombre de chélates (5 chélates envisagés) radiomarqués avec différents isotopes (Tc-99m, Ga-68 et Lu-177) sur des souris saines. Une fois le meilleur chélate sélectionné, dans l'idéal celui permettant de lier aussi bien le Tc-99m ou le Ga-68 et le Lu-177, celui-ci sera couplé à une molécule d'intérêt connue et des études biologiques de biodistribution et d'imagerie seront réalisées sur des souris saines et des souris immunodéficientes, chez lesquelles pourra avoir été implantée en sous-cutanée une lignée de cellules tumorales. L'étude de la biodistribution du radiotraceur sera réalisée à différents temps suivant son administration.

Tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) : ce projet fait suite à l'ensemble des études *in vitro* réalisées pour démontrer la stabilité des chélates radiomarqués, l'évaluation de la biodistribution *in vivo* nécessite maintenant l'utilisation d'animaux. 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 total 348 animaux (228 contrôles et 120 porteurs de tumeurs) sur 3 ans seront inclus au maximum dans ces études.

16208 Les maladies non-alcooliques du foie (i.e. NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease) sont devenues une priorité de santé publique à cause de leur prévalence grandissante (20% de la population générale et plus 70% des personnes obèses). Elles débutent avec la stéatose hépatique (foie gras), stade bénin, caractérisé par l'accumulation de gras dans cet organe, qui peut progresser vers la stéatohépatite (complication du stade précédent avec présence d'inflammation et de mort cellulaire), propice au développement des cirrhoses et cancers du foie. Bien que les causes/mécanismes de cette progression pathologique restent à clarifier, l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PE) seuls ou mélange, est suspectée. Il apparaît donc urgent de développer de nouveaux modèles permettant de mieux évaluer l'impact des PE sur la santé, en particulier dans les NAFLD. Etant donné la nature complexe de ces pathologies qui dépendent des interactions étroites entre différents organes et types cellulaires, il est indispensable d'avoir une approche intégrative uniquement retrouvée dans les modèles *in vivo*. Ainsi, un projet a été initié avec une stratégie en deux temps : d'abord un criblage de l'impact sur le foie de l'exposition chronique à des mélanges de PE dans un modèle de larve de poisson-zèbre avec stéatose suivi de la confirmation de ces effets dans un modèle murin pertinent. Concrètement, il s'agira d'étudier l'impact sur le foie de 4 PE couramment détectés dans l'air ambiant et l'alimentation : une dioxine ; deux plastifiants ; un pesticide. Ainsi, nous chercherons : 1) à évaluer la toxicité et les effets de chaque PE sur la progression de la stéatose dans la larve de poisson-zèbre; 2) à étudier les effets cocktail d'un mélange à faibles doses; 3) à identifier des marqueurs précoces d'exposition ou d'atteintes du foie ; 4) à valider ces résultats dans un modèle murin de stéatohépatite.

Bien que le recours aux modèles *in vivo* soit indispensable à l'étude des NAFLD, afin d'éviter l'utilisation massive des modèles de mammifères classiquement employés, il apparaît intéressant d'évaluer l'utilisation d'un modèle moins évolué mais tout aussi adapté ; c'est dans ce sens que ce projet a été orienté sur l'utilisation de la larve de poisson-zèbre. Ainsi, l'un des objectifs du projet est de valider l'utilisation des larves de poisson-zèbre comme modèle prédictif des effets des PE sur le foie en le comparant à un modèle de souris (3R : Remplacement ; le versant souris de ce projet fera l'objet d'une saisine particulière). En effet, ce modèle possède de nombreux atouts dont une grande similitude physiopathologique avec l'Homme, en particulier concernant le foie.

D'un point de vue expérimental, notre projet consiste à évaluer les effets des différents PE seuls ou en combinaisons sur des larves âgées de 5 à 8 jours et nourries avec un régime enrichi en graisse conduisant au développement d'une stéatose préalable. Le projet, d'une durée de 24 mois, inclut au maximum 5265 larves sur l'ensemble du projet : 1560 larves pour l'étude de toxicité de chaque PE permettant de déterminer les concentrations utilisées lors des expériences de test des mélanges; puis 1450 pour déterminer clairement les modes d'action de ces molécules et enfin 2255 larves pour l'évaluation des effets des différents mélanges.

Les procédures expérimentales mises en œuvre s'effectueront au plus proche des conditions physiologiques de vie de l'animal avec des enceintes et eau chauffées à 28°C. Nous veillons dans nos procédures et notre stratégie expérimentale à respecter la règle des 3R. Le recours à l'expérimentation animale est indispensable à l'atteinte des objectifs du projet : valider l'utilisation de modèle poisson-zèbre en alternative au modèle rongeur dans le contexte de l'étude des effets des PE sur le foie (3R : Remplacement). Les plans d'expérimentations ont été réalisés de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en vue de l'obtention de résultats significatifs et d'éviter les réplicats inutiles (3R : Réduction). Les études seront conduites dans le respect des normes les plus strictes en matière de soins des animaux et d'évaluation de la souffrance animale. Les animaux seront maintenus dans des installations modernes et agréées pour assurer un confort maximal aux animaux. Tout le personnel impliqué dans le travail des animaux a suivi une formation conformément aux réglementations institutionnelles et aux lois nationales relatives à la protection des droits des animaux (3R : Raffinement)

16209 Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. La radiothérapie (RT) représente le 2e traitement du cancer le plus utilisé après la chirurgie, avec 60% des patients qui ont recours à la RT. Cependant, la RT est un traitement localisé de la tumeur. Nous observons une rechute ou récurrence importante chez différents types de cancers comme celui du sein, du poumon, du foie ou encore du pancréas. Cette récurrence peut être locale ou à distance, appelée alors métastase. Le taux de mortalité après une rechute est très important. La recherche se doit d'être accrue pour pouvoir trouver des traitements efficaces.

Dans ce projet, nous allons évaluer une approche pour le traitement des récurrences et des métastases, basé sur la RT. En effet, il a été montré que la RT, bien qu'étant un traitement localisé, peut déclencher une réponse immunitaire. L'idée à la base de ce projet est d'augmenter cette réponse immunitaire antitumorale et la rendre systémique, donc efficace aussi à distance. Pour cet objectif, nous sommes intéressés à une voie de signalisation qui induit la production des cytokines (substances solubles de signalisation synthétisées par des cellules immunitaires ou d'autres types cellulaires ou tissus), qui vont jouer un rôle pro ou antitumoral dans le microenvironnement tumoral, stimuler la maturation et la migration de cellules immunitaires en périphérie de la tumeur et in fine déclencher une réponse antitumorale systémique. La stimulation de cette voie a déjà été combinée avec la RT, et la combinaison s'est montrée efficace sur la tumeur ciblée (en locale). Dans ce projet, nous souhaitons effectuer une triple combinaison radiothérapie + stimulation des cytokines + immunothérapie pour obtenir des effets antitumorale à distance (systémiques). Etudier les effets que peuvent avoir la triple combinaison est donc une nouvelle piste de traitement pour les cancers métastatiques.

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 des filaments de cartons 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 1041 sur 4 ans

16210 L'objectif est d'étudier l'impact de la salinité sur la structure du groupe et le métabolisme chez le mulot porc *Chelon ramada* et le mulot lippu *Chelon labrosus*. Depuis quelques années, la régression des stocks des autres espèces exploitées, semble amener les mulots à devenir l'une des dernières espèces exploitées par la pêche professionnelle. Plusieurs espèces de mulots sont intégrées dans les plans d'actions de gestion des poissons migrateurs en raison du manque de connaissances biologiques et écologiques de ces espèces. Ce projet vise à enrichir les connaissances de ces deux espèces et particulièrement le comportement social lors de la migration mer-estuaire. Il semblerait que ces deux espèces aient des patterns d'osmorégulation différents pouvant expliquer la remontée des rivières plus ou moins prononcée et que les mulots se déplacent en groupe composé de plusieurs espèces de mulots de tailles différentes.

Cependant, nous n'avons aucune information concernant l'impact de la salinité sur la structure de ces groupes. Cette étude cherchera à comprendre si le déplacement de ces deux espèces correspond à une agrégation sociale ou à un groupe hautement polarisé et si les capacités différentielles d'acceptation de l'eau douce chez ces deux espèces ont un impact sur la formation du groupe et sur le métabolisme individuel (étude comportementale donc poissons non remplaçables). Il est prévu de pêcher au verveux puis d'élever 90 juvéniles de mulots (mulot porc = 45; mulots lippu = 45) durant 2 mois dans une animalerie agréée. Ces 90 poissons permettront de tester trois compositions (tailles et espèces différentes) de groupe (chaque groupe étant composé de 10 poissons, le minimum pour tester un groupe) différentes en triplicat, nécessaire pour une analyse statistique viable (réduction). Les animaux seront nourris quotidiennement avec la dose recommandée pour assurer une croissance régulière (raffinement). Un contrôle de croissance sera réalisé deux fois par mois afin de s'assurer du bien-être des animaux. Afin d'étudier la structure du groupe, les poissons seront placés en groupe de 10 individus (le minimum pour former un groupe) dans un canal simulant les mouvements et la vitesse d'une entrée en estuaire. En faisant varier la taille des individus et les espèces pour chaque groupe, 9 groupes seront testés dans le canal hydrodynamique (structure du groupe) et dans les tunnels de nage (consommation d'oxygène) afin d'avoir le minimum pour effectuer des statistiques viables. Les poissons ramenés au laboratoire pour l'expérimentation seront à l'issue des deux mois d'expérimentation relâchés en milieu naturel sur le lieu où ils ont été capturés.

16211 Le cancer colorectal représente un problème majeur de santé publique et touche près de 45 000 personnes en France. C'est la deuxième cause de décès par cancer avec près de 18 000 décès par an. Bien que la chirurgie constitue le traitement de base du cancer colorectal, la chimiothérapie et les thérapies ciblées sont souvent nécessaires après la chirurgie dans le but de réduire le risque de récurrence. Toutefois, ces traitements se montrent parfois inefficaces. Il apparaît donc essentiel de mieux analyser les différents événements moléculaires et cellulaires intervenant tout au long du processus tumoral intestinal afin d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques. L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de la reprogrammation métabolique dans le contrôle de la tumorigenèse intestinale. Nous faisons l'hypothèse qu'en agissant sur le métabolisme énergétique et en limitant la reprogrammation métabolique des cellules tumorales, la prolifération tumorale pourrait être ralentie ou bien stoppée. Dans le cadre de cette étude, nous nous attacherons à : 1) définir l'impact d'une modulation du métabolisme énergétique cellulaire sur l'initiation et la progression du cancer en ciblant

directement la cellule tumorale ou les cellules de son micro-environnement (cellules immunitaires connues pour influencer le développement tumoral); 2) déterminer le potentiel thérapeutique d'agents pharmacologiques dans le contexte du cancer colorectal. Seule une approche intégrée par l'expérimentation animale, mimant le développement du cancer colorectal, est envisageable en raison de la complexité des relations entre les différents types cellulaires existant au sein d'une tumeur et ne peut être remplacée par des analyses *in vitro*. Nos travaux reposent sur la caractérisation de modèles murins génétiquement modifiés. Le nombre de souris utilisées sera de 1080 sur 5 ans. Nous analyserons l'impact d'une part de la délétion génique et d'autre part de l'activation pharmacologique d'un régulateur clé du métabolisme énergétique cellulaire sur la tumorigénèse colique dans 2 modèles de cancer colorectal chez la souris. Un modèle de carcinogenèse chimique pour étudier son rôle dans l'initiation du processus tumoral, et un modèle génétique inductible par le tamoxifène afin d'étudier son rôle dans la progression tumorale. Nos procédures expérimentales correspondent à l'induction d'un cancer colorectal par injection d'un produit tumorigène ou par suppression génétique de l'expression d'un suppresseur de tumeur, ensuite au traitement par voie orale avec différentes molécules pharmacologiques pour évaluer leur potentiel thérapeutique sur le développement tumoral. Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, une surveillance permanente sera effectuée et intensifiée pendant les phases potentiellement délétères, en respectant des points limites définis permettant d'anticiper la mort de l'animal en cas de souffrance. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de limiter le nombre d'animaux nécessaires tout en s'assurant de la reproductibilité et d'une analyse statistique efficace des résultats. L'élevage des souris sera en adéquation avec le nombre minimal requis. Pour réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, nous utiliserons des techniques non invasives comme l'imagerie par échographie et la coloscopie qui permettent un suivi longitudinal du développement de la tumorigénèse colique. Cette approche méthodologique nous permet de faire des études sur des tumeurs de petites tailles, à des stades précoces, ce qui évite la souffrance engendrée par un développement tumoral important. Une veille scientifique continue sera effectuée évitant ainsi toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. A terme, les résultats de ce projet permettront le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir et traiter le cancer colorectal.

16212 L'agressivité du glioblastome, une tumeur cérébrale de haut grade chez l'homme, est corrélée positivement à la présence de cellules cancéreuses souches (GSC) et à leur résistance aux traitements. Ces cellules souches cancéreuses sont situées dans une niche où elles établissent des interactions privilégiées avec les cellules environnantes, notamment les cellules vasculaires qui modifient leurs propriétés de manière réciproque.

Des données précédentes de notre laboratoire ont permis de montrer que bloquer la communication entre cellules cancéreuses souches et cellules vasculaires réduit la progression tumorale *in vitro* et *in vivo* chez la souris. Nos travaux récents suggèrent *in vitro* qu'une partie de la communication entre les GSC et cellules vasculaires dépend de l'expression de facteurs d'adhésion. Une autre partie est médiée par la libération de vésicules extracellulaires, des mini-cargos contenant des informations pro-adhésion et pro-tumorales participant à la résistance aux traitements. Il est nécessaire de valider ces résultats dans un modèle expérimental *in vivo* qui reproduit au mieux les conditions pathologiques.

Les expériences de progression tumorale seront réalisées par implantation sous-cutanée ou intracrânienne des cellules tumorales primaires humaines (GSC) chez la souris immunodéficiente (*Mus musculus*, BALB/c nude). De la même manière, des cellules tumorales de souris seront implantées chez la souris immunocompétente pour validation en modèle syngénique avec système immunitaire mature (*Mus musculus*, C57BL/6). Les souris immunodéficientes NSG (*Mus musculus*, NOD-SCID - IL2Rg) seront choisies pour l'implantation sous-cutanée et intracrânienne des cellules tumorales humaines dont la prise de greffe est plus difficile. Au total, ce projet devrait nécessiter l'utilisation de 620 souris, préférentiellement des BALB/c nude, mais quand cela s'avèrera nécessaire, ponctuellement les deux autres.

Tout au long de ces études, des méthodes alternatives de culture et d'analyses des cellules *in vitro* seront utilisées pour disséquer les mécanismes moléculaires sous-jacents. En outre, un nombre de dix animaux par groupe (ou 5 animaux ayant chacun deux tumeurs pour le modèle sous-cutané) permettra

d'assurer la puissance statistique nécessaire à l'analyse des données expérimentales. Les groupes contrôles seront partagés entre plusieurs groupes expérimentaux dès que possible et plusieurs paramètres seront mesurés par protocole : ces dispositions permettront de réduire le nombre d'individus tout en assurant la qualité des résultats expérimentaux.

L'évaluation du bien-être animal, la définition de points limites et la réduction de la douleur contribueront au raffinement des protocoles. Les animaux seront hébergés dans des cages ventilées où la température et l'hygrométrie sont contrôlées. Les souris y seront placées avec des congénères (5 max/cage), un enrichissement (frisottis) et surveillés quotidiennement.

Les résultats obtenus *in vivo* devraient permettre d'apporter les preuves de concept nécessaires au développement futur d'outils thérapeutiques et/ou diagnostiques dans le cadre des tumeurs du cerveau chez l'homme.

16213 Les maladies du rein sont un problème de santé publique de plus en plus grave dans les sociétés occidentales. En France, plus de 45 000 personnes souffrent d'une insuffisance rénale de stade terminal, jusqu'à 7000 nouveaux cas sont dénombrés chaque année. Au cours du développement de la maladie rénale, le rein perd sa capacité de filtration. Cela provoque une augmentation des protéines présentes dans l'urine. La perte des protéines dans l'urine entraîne un certain nombre de symptômes tels que l'œdème, l'excès de graisses dans le sang et des problèmes de coagulation. Les protéines sont aussi responsables du transport des lipides et, par conséquent, un excès des protéines dans l'urine entraîne également un excès de graisses pour les cellules rénales. L'excès de graisse est toxique pour tous les organes, et le rein ne fait pas exception. La Cubiline est un récepteur membranaire spécialisé dans la captation des protéines. La Cubiline présente un mode d'expression restreint et est présente uniquement dans les reins et l'intestin. Des études de cohorte chez l'homme suggèrent un rôle protecteur de la carence de Cubiline contre la maladie rénale. Avec ce projet, nous souhaitons étudier si le blocage de l'absorption des protéines via la Cubiline dans les tubules rénaux peut ralentir la progression de la maladie.

Le syndrome néphrotique est une affection rénale avec des conséquences néfastes pour l'organisme entier. Seule l'expérimentation animale permet d'étudier correctement les symptômes et les interactions entre les organes au cours de la maladie, comme les dommages au niveau des glomérules affectant les cellules tubulaires. Nous travaillerons avec des modèles de souris pour étudier la maladie. Ces modèles seront générés par modifications génétiques ou par administration de médicaments. Nous analyserons la fonction rénale en réalisant des prélèvements urinaires. Après 4, 6 et 8 semaines, les souris seront euthanasiées pour prélever les organes afin d'étudier l'histologie et les mécanismes moléculaires induits par les lésions rénales. Des études d'espérance de vie seront également réalisées. Le nombre de souris utilisées sera de 416 pour une durée de 5 ans.

Nous utiliserons différentes lignées de souris modifiées génétiquement afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les lésions tubulaires. En accord avec le principe des 3R nous cherchons à valider *in vivo* et *in vitro* des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études chez la Drosophile. Pour respecter ce principe, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. Notre expérience avec ce modèle de souris nous a permis de raffiner et de réduire la dose des médicaments utilisés. Les expériences conçues pour analyser les mécanismes moléculaires de la toxicité des lipides spécifiquement dans les tubules proximaux ont été remplacées pour des expériences en culture cellulaire. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et le stress infligé 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. Avec ces recherches, nous espérons élargir la compréhension des mécanismes qui protègent le rein et ainsi concevoir des stratégies thérapeutiques contre l'insuffisance rénale.

16214 Les mammifères sont soumis à des cycles d'alternance de trois états de vigilance : l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal. Le passage de l'un de ces états à un autre nécessite la mise en jeu de différents réseaux neuronaux, impliquant notamment le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO) de l'hypothalamus, une structure cérébrale, pour le déclenchement et le maintien du sommeil lent.

L'alternance entre l'éveil et le sommeil lent, la première phase du sommeil, est régulée par des interactions inhibitrices réciproques entre les neurones du VLPO et les structures responsables de l'éveil. L'activation des neurones du VLPO induisant le déclenchement et le maintien du sommeil lent fait intervenir deux processus : l'un homéostatique (accumulation de facteurs qui promeuvent le sommeil au cours de l'éveil) et l'autre circadiens (régé par l'horloge interne).

Toutefois, bien que le sommeil soit un processus biologique universel et essentiel à la vie, les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu pendant le sommeil lent au sein du VLPO restent encore méconnus et représentent un défi majeur pour les neurosciences modernes. En effet, les troubles du sommeil touchent encore 30 % de la population française et favoriseraient l'apparition de nombreuses pathologies telles que l'hypertension artérielle, le diabète, la dépression ou encore les accidents vasculaires cérébraux. Ainsi, nous avons pour objectif d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans le VLPO au cours du sommeil lent.

Ce projet de 4 ans se déroulera en plusieurs grandes étapes. Tout d'abord nous nous intéresseront aux rôles de facteurs trophiques dans la régulation des interactions neurogliales au sein du VLPO et donc dans la régulation du sommeil lent. Pour cela nous réaliserons des injections de vecteurs viraux et d'agents pharmacologiques permettant d'inactiver spécifiquement certaines voies de signalisation cellulaire dans le VLPO. Ainsi, grâce à des enregistrements polysomnographiques (Electroencéphalogramme, électromyogramme, électrocardiogramme), nous étudierons, *in vivo*, les effets sur la qualité et la quantité du sommeil lent des souris. Dans un second temps, nous étudierons *ex vivo* dans le VLPO de ces souris les variations morphologiques de la plasticité cellulaire des neurones et des astrocytes et les variations électrophysiologiques de ces neurones au cours du cycle veille-sommeil. Pour cela, les animaux précédemment utilisés pour les tests comportementaux seront euthanasiés dans l'objectif de prélever les cerveaux afin d'effectuer des analyses histologiques et électrophysiologiques.

La réalisation de ce projet nécessitera 604 animaux.

Ce projet respecte les principes énoncés par les 3R (remplacement, réduction, raffinement). Le nombre d'animaux utilisés est minimisé autant que possible et correspond au minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiques statistiquement 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, ce projet étudie une fonction biologique, en l'occurrence le sommeil, qui ne peut pas être étudié *in vitro*.

Chaque animal fera l'objet d'une surveillance accrue pendant la procédure, pendant les jours suivants et bien sûr pendant les expérimentations. Nos souris sont hébergées en groupe (6 animaux par cage au maximum et jamais d'animal isolé) en animalerie. 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. Un suivi en plus sera réalisé pour les animaux après chirurgie, afin de vérifier en plus la cicatrisation de la plaie et des antalgiques seront utilisés si des signes de douleur se manifestent.

A la fin des expérimentations *in vivo*, les cerveaux seront prélevés, après euthanasie, afin de mener des expériences histologiques, électrophysiologiques et, dans le cas d'implantation d'électrodes, de vérifier que les coordonnées d'implantation sont correctes. Enfin, un petit groupe d'animaux recevra une perfusion intracardiaque sous anesthésie générale afin de préparer les cerveaux à certaines expériences comme le FISH (Hybridation *in situ* en fluorescence, afin de marquer et localiser les ARNm) ou encore pour la transparençation de cerveau.

16215 Les souris transgéniques sont les animaux de laboratoire les plus utilisés et les plus échangés dans le monde. Lors de ces échanges, il est indispensable de conserver les statuts sanitaires des animaleries importatrices. La possibilité de contamination des souris durant le transport et la stabulation de longue durée au sein d'une même structure augmentent également ce risque sanitaire.

Au niveau de notre plateforme, nous devons limiter au mieux les risques de contamination liés à l'importation de souris transgéniques (en moyenne 5 à 10 lignées par an) ou de souches d'animaux consanguins ou non consanguins dans nos animaleries.

De plus, nous avons aussi des sites de statuts sanitaires différents au sein de notre plateforme (conventionnel ou Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique = EOPS) et de ce fait les transferts de lignées de souris ne peuvent pas se faire directement par transfert de souris vivantes sous peine de contaminer nos zones.

Nous devons également être capables de palier à une éventuelle contamination de nos souches EOPS afin de conserver un statut sanitaire compatible avec certaines thématiques de recherche (immunologie). Un statut sanitaire EOPS est également indispensable à l'envoi de rongeurs provenant de nos élevages vers d'autres laboratoires extérieurs.

La création de lignées transgéniques est très couteuse en temps et en argent et la valeur scientifique de ces modèles est souvent inestimable. Les projets de recherche demandant le plus souvent l'utilisation de nombreuses lignées sur le long terme, le transfert d'embryons est la méthode actuellement la plus sûre pour garantir au mieux le statut sanitaire de nos animaleries. Une infection de nos animaux, selon le type de pathogène, peut « au mieux » invalider l'interprétation des résultats expérimentaux et au pire entraîner des pathologies et la mort des animaux. Cette technique d'importation des animaux constitue donc déjà un raffinement permettant d'augmenter la fiabilité des résultats (et donc limite la variabilité et le nombre d'animaux nécessaires pour les tests expérimentaux) mais également le bien être des animaux de nos élevages.

Pour la production des 30 à 40 embryons nécessaires pour la décontamination d'une lignée, la technique nécessite l'utilisation de 2 à 4 souris femelles selon les performances zootechniques de la lignée. Pour 10 lignées importées et une dizaine de transfert entre zones ou de décontamination, nous utiliserons donc au maximum 80 femelles par an, soit 400 souris donneuses d'embryons sur 5 ans. Les embryons seront réimplantés chez des femelles porteuses (15-20 embryons par femelle) qui seront triées avec soin pour garantir la meilleure gestation et donc le maximum d'efficacité. A raison de 2-3 femelles réimplantées par lignées, nous aurons donc besoin d'au maximum 60 femelles réimplantées utilisées par an et donc 300 sur 5 ans.

Environ 20 mâles vasectomisés seront utilisés pour la production de femelles pseudogestantes par an donc 100 sur 5 ans.

Un total de 800 animaux maximum sera utilisé sur 5 ans.

Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation d'animaux vivants permettant la décontamination d'une souche de rongeurs.

Le souci de réduction est permanent en choisissant les animaux les plus performants afin d'en réduire le nombre nécessaire. Les techniques de superovulation et de tri en oestrus permettent d'augmenter l'efficacité de la production d'embryons. Les femelles ne présentant pas de signes d'oestrus pourront être réutilisées dans le cadre de la même procédure, ceci concernant les femelles donneuses d'embryons et les femelles pseudo gestantes. L'utilisation de femelles pseudogestantes augmente les chances de succès de cette technique. De même, les mâles vasectomisés pourront être utilisés sur plusieurs souches. Les mâles reproducteurs seront "empruntés" dans les élevages de notre plateforme et ne sont donc pas comptabilisés dans cette saisine. L'ensemble de ces précautions permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

L'ensemble des animaux sera hébergé dans des cages ventilées dans des pièces à température et hygrométrie contrôlées. Les cages seront enrichies de maisonnettes permettant un abri et de coton permettant la nidification.

L'ensemble des animaux sera soumis à une surveillance quotidienne. L'apparition de signes de douleur ou d'atteinte de l'intégrité physique de l'animal engendrera une prise en charge (anesthésiants, analgésiques), la mise en place de soins ou une sortie de l'animal de l'expérimentation.

16216 Le but général est de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines rares (myopathies) et de tester l'éventuelle amélioration des signes de la maladie grâce à différentes

approches thérapeutiques. Le travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, des modèles cellulaires ont été utilisés dans un premier temps pour étudier les gènes dérégulés et pour faire un criblage de plusieurs composés thérapeutiques afin de sélectionner le meilleur. Il est maintenant prévu d'utiliser des souris mimant la myopathie centronucléaire liée à l'X (XLCNM) pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la pathologie dans ce modèle vivant et s'intéresser à la recherche de biomarqueurs.

Les myopathies centronucléaires (CNM) sont des myopathies congénitales très sévères caractérisées par une faiblesse musculaire, une forte atrophie et des anomalies de la structure des fibres musculaires. La myopathie centronucléaire liée à l'X est la plus commune et la plus sévère des formes de myopathies centronucléaires, caractérisée par une hypotonie néonatale sévère et un décès précoce. Elle est due à des mutations de la myotubularine (MTM1). Des souris *Mtm1* knockout (qui n'expriment pas MTM1) reproduisent le phénotype de la myopathie centronucléaire liée à l'X avec des caractéristiques histologiques classiques comme un défaut de localisation des noyaux et une atrophie musculaire, associées à une faiblesse musculaire progressive, conduisant à la mort entre 6 et 12 semaines.

Il a été montré précédemment qu'un niveau trop élevé de la dynamine 2 dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Deux approches utilisant d'une part un croisement génétique dans le but de diminuer l'expression de dynamine 2 de 50% et d'autre part une approche thérapeutique utilisant un composé injectable capable aussi de diminuer le niveau de dynamine 2 ont été utilisées. Chez des souris malades exprimant 50% de dynamine 2 ou injectées avec le composé, le rétablissement quasiment total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie a été obtenu ainsi que l'allongement de leur durée de vie. A ce jour, il n'existe pas de méthode de prédiction de sévérité de la maladie et de progression mis à part le fait de monitorer les symptômes des patients étant donné que des biomarqueurs moléculaires sont manquants. Le but actuel est d'identifier des biomarqueurs pour monitorer la maladie et la progression de la myopathie centronucléaire liée à l'X en utilisant des nouvelles technologies. En parallèle, cette approche thérapeutique (composé injectable) sera utilisée pour déterminer si les niveaux des différents biomarqueurs sont restaurés chez la souris, ce qui permettra également d'identifier des biomarqueurs de suivi de l'efficacité du traitement.

Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, de mieux comprendre leur développement et de tester des thérapies. Ces effets ne peuvent être observés que sur un organisme vivant, c'est pourquoi nous utiliserons des souris. Aucune autre alternative expérimentale n'existe. Les souris seront analysées *in vivo* et *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum deux par jour avec un temps de repos adéquat) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris/groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Ainsi, un maximum de 807 souris sera utilisé. Une surveillance quotidienne permettra de repérer précocement les signes de souffrance/douleur/stress. Afin d'améliorer le bien être animal tout au long de la vie de l'animal, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées par un enrichissement dans toutes les cages (ajout de matériel pour faire un nid), le regroupement des animaux de même sexe pour limiter l'isolement et favoriser le comportement social. De la nourriture adaptée à ce modèle de souris sera utilisée. Lors de l'expérimentation, tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau observé, limitant ainsi la souffrance de l'animal. Pour les procédures expérimentales invasives, plusieurs mesures seront prises pour maintenir le bien être animal comme le recours à l'anesthésie et l'utilisation d'un tapis chauffant afin de maintenir la température corporelle des animaux si la procédure expérimentale implique une anesthésie. Toujours en cas d'anesthésie, les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil complet puis suivis ensuite quotidiennement via une fiche scoring pour définir les points limites permettant de limiter la souffrance, la douleur et le stress (RAFFINEMENT).

16217 Le sous-projet de ce dossier s'intègre dans un projet global majoritairement conduit sur un autre site et brièvement décrit ci-dessous.

PROJET GLOBAL : Un enjeu majeur pour les élevages de ruminants en France est de favoriser une transition vers des systèmes herbagers et peu dépendants d'intrants. Cette transition peut être facilitée par des réorientations des objectifs de sélection génétique. Chez les ovins, deux objectifs privilégiés pour cela sont l'amélioration de la résistance au parasitisme et l'amélioration de l'efficacité alimentaire. Le parasitisme est une des principales contraintes au pâturage. En particulier les nématodes (vers ronds) gastro-intestinaux sont ingérés en même temps que l'herbe et provoquent un affaiblissement général de l'animal, une plus grande susceptibilité aux maladies, une baisse de la production, et un coût supplémentaire pour l'éleveur (achat de vermifuge). Plutôt que d'utiliser des vermifuges, on a démontré la faisabilité de sélectionner des moutons résistants au parasitisme. Cette résistance est effective pendant le jeune âge mais on ne connaît pas encore ni comment elle s'exprime, ni dans quelles conditions elle est maintenue (stade physiologique, conditions d'élevages).

Les objectifs du projet global sont (i) de mieux caractériser les mécanismes de résistance au parasitisme qui ont été sélectionnés ainsi que leur expression pendant la croissance et pendant la vie adulte, et (ii) quantifier les effets de la sélection des ovins sur la résistance au parasitisme.

Pour ce projet nous utiliserons des moutons issus de lignées divergentes pour la résistance au parasitisme gastro-intestinal (une lignée résistante R et une lignée sensible S).

SOUS-PROJET DONT LES PROCEDURES SONT REALISEES SUR LA PLATEFORME:

Au total 20 agnelles seront utilisées.

A environ 4 mois d'âge, 60 femelles des lignées R et S (23 par lignée) seront incluses dans un protocole d'infestations expérimentales contrôlées avec *Hæmonchus contortus* (le principal nématode pathogène très répandu en France). Ce protocole vise à mimer l'immunisation naturelle des jeunes animaux mis à l'herbe mais à partir d'une dose connue de larves infestantes.

Parmi ces 60 femelles R et S, 18 d'entre elles (9 de la lignée R et 9 de la lignée S) seront transportées sur une plateforme de l'EU pour évaluer la possibilité d'utiliser des mesures par imagerie (CT-scan et IRM) plutôt que des mesures terminales (analyse post-mortem) afin d'estimer la charge parasitaire dans la caillette. Les mesures d'imagerie viseront aussi à caractériser de façon non-invasive la composition en différents tissus et leurs dimensions (ex : taille du rumen). Pour toutes ces mesures d'images, les animaux seront anesthésiés au préalable pour garantir l'immobilité nécessaire à la capture d'image et pour réduire le stress.

Après les mesures d'imagerie, nous mesurerons la charge parasitaire dans la caillette. Cette mesure est nécessaire ici pour déterminer sur quelle(s) phase(s) les mécanismes de résistance sélectionnés agissent. Les mesures seront réparties sur 3 jours différents (7, 14, et 35 jours après infestation) sur 3 femelles R et 3 femelles S à chaque jour.

En amont du protocole d'imagerie prévu avec les 18 femelles des lignées R et S, nous effectuerons un premier test avec 2 agnelles de ces mêmes lignées. Ce test comprendra une agnelle infestée expérimentalement et une agnelle non-infestée. Il permettra de préparer la procédure d'imagerie sur le plan technique (e.g. calibration des appareils, repérage des zones à cibler). Les deux agnelles seront transportées en même temps que les agneaux RFI (saisine 23816) depuis leur site d'hébergement jusqu'à la plateforme. Après une nuit sur place pour récupérer du stress du transport, elles seront anesthésiées pour un passage au CT-scan et IRM. Après leur réveil, elles seront rapatriées sur leur site d'hébergement.

3 R :

- Remplacer : On ne peut pas remplacer l'hôte (le mouton) pour la réalisation du cycle parasitaire et l'étude de l'impact de la sélection à la résistance aux parasites sur les autres fonctions biologiques de l'hôte. Pour connaître l'action des mécanismes de résistance sur le cycle parasitaire, actuellement la seule possibilité est d'effectuer des mesures terminales du nombre de parasites dans la caillette. Pour la composition corporelle, les mesures par imagerie sont choisies à la place des mesures par dissection de la carcasse. Les données expérimentales serviront à la calibration d'un modèle mathématique. Ceci permettra d'utiliser la simulation numérique plutôt que l'expérimentation animale pour explorer les réponses sur une gamme plus large des conditions de milieu.

- Réduire : Le nombre d'animaux prévus dans l'expérimentation a été limité au maximum pour avoir un effectif garantissant l'interprétation des données.

- Raffiner : Les animaux étudiés dans ce projet sont élevés dans une unité expérimentale située à 200km du site d'imagerie. Afin d'éviter tout risque au moment de l'anesthésie lié au stress généré par le transport, les animaux arriveront la veille de l'acquisition d'images. Sur place, il sera garanti qu'aucun animal ne se retrouvera isolé de ses congénères, en dehors de la phase d'acquisition d'images.

Afin d'affiner la préparation de la procédure d'imagerie, 2 agnelles seront utilisées en amont du protocole.

16218 La douleur est un processus physiologique nécessaire à la survie : elle prévient l'organisme d'un danger imminent et permet la mise en œuvre de réponses adaptées qui visent 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 mais provoque au contraire une extrême souffrance. C'est notamment le cas des douleurs neuropathiques ou inflammatoires qui apparaissent suite à une lésion ou inflammation du système nerveux périphérique ou central. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il est donc essentiel de découvrir de nouveaux traitements, et pour ce faire, de disséquer les mécanismes responsables de la genèse d'une douleur chronique.

Parmi les symptômes douloureux, il existe l'allodynie qui correspond à une douleur provoquée par une stimulation normalement non douloureuse qui peut être déclenchée suite à une inflammation.

En temps normal, les informations tactiles et douloureuses n'aboutissent pas au même niveau de la moelle épinière ou du tronc cérébral, les deux modalités sensorielles (tact et douleur) sont donc normalement séparées. En conditions pathologiques, par exemple lors d'une allodynie, l'information tactile devient capable d'activer des neurones nociceptifs, grâce à un circuit qui implique plusieurs cellules. Le tact va alors devenir douleur (allodynie mécanique). Ce processus va provoquer l'activation de plusieurs populations neuronales et implique également une population spécifique de cellules gliales, les astrocytes. Cependant, peu de choses sont connues sur ces cellules et leur implication dans le déclenchement de l'allodynie lors d'une inflammation. L'objectif général de ce projet va consister à étudier l'implication des astrocytes et plus précisément l'expression de marqueurs spécifiques des astrocytes (notamment des canaux potassiques astrocytaires), dans un modèle de douleur inflammatoire chronique faciale, dans un modèle de douleur neuropathique et dans un modèle de migraine chronique. Ce projet combinera des analyses immunohistologiques, des études comportementales et d'expression protéique chez le jeune rat (3-4 semaines et sur le rat adulte >5 semaines). Il présente donc un intérêt fondamental, et également un intérêt plus appliqué en permettant éventuellement de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques visant à diminuer les douleurs pathologiques chez l'homme.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 420 animaux sur 1 an, afin de s'assurer une étude significative réalisée sur des animaux jeunes et d'effectuer un décours temporel de l'activation astrocytaire dans l'apparition et le maintien de l'allodynie mécanique. Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au maximum à partir de l'expérience dans le domaine et des tests statistiques donnant le nombre nécessaire pour la discrimination des effets. Les analyses immunohistologiques seront réalisées au préalable afin d'effectuer une mise au point sur la visualisation d'une activation astrocytaire en condition inflammatoire, qui nous permettront par la suite d'établir le protocole expérimental et de réduire le nombre d'animaux utilisés pour la quantification des marqueurs astrocytaires. Les animaux utilisés pour le comportement seront utilisés pour l'étude d'expression protéique. Ce nombre sera diminué au cours des étapes si les résultats comportementaux sont significatifs. De plus, comprendre la physiologie de la douleur nécessite l'utilisation du modèle animal. Ainsi, aucune méthode alternative actuelle ne permet de remplacer les protocoles nécessaires à la réalisation de ce projet. Au cours des procédures expérimentales (injection et chirurgie), les animaux seront anesthésiés. Et pendant l'expérimentation, une observation régulière des points limites, tels qu'une perte de poids et/ou un déficit moteur, sera effectuée. En cas d'atteinte de ces points, l'animal sera retiré de l'expérimentation, par euthanasie de l'animal afin de lui éviter toute souffrance. Enfin, les animaux seront 3 par cage de 800 cm² (enrichissement social) dans l'animalerie thermorégulée (22±1

°C), avec hygrométrie contrôlée et cycle de lumière inversé (lumière de 19h à 7h). L'accès à la nourriture et à l'eau sera ad libitum et un changement de litière sera effectué 2 fois par semaine.

16219 Exploiter le système immunitaire pour reconnaître et détruire les cellules tumorales est l'objectif central de l'immunothérapie contre le cancer. Au cours des dernières années, l'immunothérapie a connu des avancées majeures, il y a eu un intérêt accru pour l'optimisation de cette technologie afin d'en faire un traitement cliniquement réalisable.

L'une des modalités d'immunothérapie est l'utilisation d'anticorps. Certains anticorps reconnaissent et se fixent sur les cellules tumorales bloquant leur croissance (anticorps anti-récepteur à un facteur de croissance par exemple), soit les détruisent directement (anticorps armés d'un médicament toxique), D'autres anticorps ciblent les acteurs de la réponse immunitaire (lymphocytes T par exemple) pour stimuler ces derniers et les aider à détruire la tumeur (anticorps bloquant les points de contrôles du système immunitaire, tel que les anticorps anti-PD1).

Plus récemment, les anticorps dits bi-spécifiques (Bispecific T cell Engagers, BiTes) ont été développés et sont devenus une approche thérapeutique très prometteuse. Il s'agit de deux anticorps regroupés en une seule molécule. Des anticorps bi-spécifiques comme le Blinatumomab (Blinicyto) ciblent d'une part les cellules tumorales et d'autre part les lymphocytes T CD3+ créant un pont entre ces deux cellules (Figure 1). Ainsi, les lymphocytes T sont rapprochés physiquement des cellules tumorales et ils sont activés via le CD3. En conséquence, ils vont détruire spécifiquement la cellule tumorale. Ces anticorps BiTes ont montré leur efficacité et sont utilisés aujourd'hui pour le traitement de certains lymphomes B (CD19+) chez les adultes et les enfants.

Toutefois, cette stratégie doit être optimisée car ces anticorps possèdent une toxicité importante due à l'activation de tous les lymphocytes. Ainsi, leur efficacité pourrait être améliorée en ne ciblant seulement que des sous-populations de lymphocytes d'intérêt.

Dans ce projet, nous allons comparer différentes stratégies de développement d'anticorps bispécifiques afin de trouver les plus efficaces contre les tumeurs et les moins toxiques pour le patient. L'efficacité sera largement testée par des expériences *in vitro*. Toutefois, pour réellement permettre l'analyse de la toxicité et de l'efficacité anti-cancéreuse ni les modèles expérimentaux *in vitro* ni les modèles mathématiques ne peuvent remplacer les expériences *in vivo* d'immunothérapie par injection des anticorps contre les tumeurs. Par conséquent, les réponses anti-tumorales seront analysées chez des souris immunodéprimées injectées avec des lignées tumorales humaines, des lymphocytes T humains et les nouveaux anticorps bi-spécifiques développés. Ce modèle de souris immunodéprimée a été choisi pour éviter le rejet des cellules humaines. Les expériences utilisant ce modèle animal 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 504 souris. La croissance tumorale est mesurée par imagerie, permettant un suivi longitudinal et non invasif des animaux et limitant leur nombre. Toutes les précautions ont été 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 selon des points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'une souffrance des animaux.

16220 Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez les hommes.

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus mortel au niveau mondial.

L'objectif principal de ce projet est de développer de nouveaux traitements contre les cancers de la prostate et du côlon. Nous disposons de quatre nouveaux vecteurs : deux anticorps anti-CAIX (qui ciblent le cancer du côlon) et deux anticorps anti-PSMA (qui ciblent le cancer de la prostate). Nous disposons de deux lignées tumorales : HT-29, cellules humaines de tumeur colorectale, et LNCaP, cellules humaines de tumeur prostatique. Ces deux lignées expriment la luciférase, et sont notées HT-29-luc et LNCaP-luc.

La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément astate 211 qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Le radioélément est lié à un anticorps spécifique de la tumeur afin de former un radiopharmaceutique, qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

Le projet se déroulera comme suit :

1) Calibrage des modèles murins. Quatre types de modèles seront développés, trois avec la lignée HT-29-luc et un avec la lignée LNCaP-luc, injectées de différentes manières chez la souris immunodéprimée SCID beige. Les quatre modèles seront :

- injection en sous cutané de la lignée HT-29-luc
- injection en sous cutané de la lignée LNCaP-luc
- injection en intrapéritonéal de la lignée HT-29-luc (pour reproduire un modèle de carcinose péritonéale)
- injection en orthotopique de la lignée HT-29-luc, c'est-à-dire dans l'organe dont la cellule tumorale est issue (cellule de tumeur colique dans le cæcum)

L'expression de la luciférase par les lignées tumorales nous permettra de réaliser des images en bioluminescence des souris greffées.

2) Escalade de doses pour évaluer la tolérance des radiopharmaceutiques sur souris saines.

3) Biodistribution des radiopharmaceutiques sur les deux modèles de souris greffées en sous-cutané. Le radiopharmaceutique est injecté aux animaux porteurs de tumeurs pour étudier sa distribution dans un organisme vivant, et la fixation du radioélément sur la tumeur et tous les organes.

4) Radiothérapie interne vectorisée sur souris greffées sur les quatre modèles.

Au total 852 souris seront utilisées pour réaliser ce programme.

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. Les souris sont hébergées par trois ou cinq en fonction des protocoles, avec des fristots pour pouvoir faire un nid. L'état général et clinique des animaux sera surveillé de façon quotidienne selon une grille de score et de points limites qui permet de déterminer le palier de douleur (4 paliers allant de 0, absence de douleur, à 3, douleur sévère). L'évaluation journalière permettra la mise en place et l'ajustement de traitements analgésiques lorsque ce sera nécessaire, en accord avec le palier de douleur observé. Les critères pris en comptes pour l'évaluation du palier de douleur sont listés en annexe.

Analgésiques utilisés :

En palier 1 (un critère de la liste en annexe): AINS : Méloxicam 2 mg/kg/jour dans l'eau de boisson. (Une souris de 25 g boit 5 mL par jour, on prépare donc des biberons à 0,01 mg/mL de Méloxicam)

En palier 2 (2 critères associés de la liste en annexe) : morphinique faible : Buprénorphine 0,05 mg/kg en sous-cutané matin et soir (soit 50 µL à 0,03 mg/mL pour une souris de 25 g).

En palier 3 : mise à mort

Pour l'analyse des résultats, tous les tests statistiques seront réalisés sous Prism. Nous utiliserons des T-tests non paramétriques pour les analyses intergroupes, et un test Logrank pour l'analyse des courbes de survie.

16221 Les troubles du spectre autistique (TSA) résultent d'anomalies du neurodéveloppement qui apparaissent précocement au cours de la petite enfance et persistent à l'âge adulte. Ils se manifestent par des altérations dans la capacité à établir des interactions sociales et à communiquer, ainsi que par

des anomalies comportementales, en particulier une réticence au changement et une tendance à la répétition de comportements ou de discours. Avec une prévalence alarmante, une naissance sur 100 en Europe, les TSA présentent un handicap lourd non seulement pour l'enfant qui en est atteint mais aussi pour son cercle familial. Alors que la composante génétique est impliquée dans 25% des cas, le rôle des facteurs environnementaux dont les polluants chimiques ainsi que leur interaction avec les facteurs génétiques restent peu étudiés. Plusieurs facteurs pré- et périnataux ont été incriminés tels que des infections virales comme celle de la rubéole ou certains médicaments (acide valproïque (VPA), thalidomide). Plus récemment, le rôle de certains polluants environnementaux en tant que facteurs aggravants dans l'émergence des TSA a été souligné. Des résultats récents obtenus chez l'Homme et chez l'animal suggèrent l'existence de modifications subtiles de différents registres comportementaux incluant les habiletés motrices, l'anxiété ainsi que l'attention chez des individus ayant été exposés précocement à des niveaux significatifs de retardateurs de flamme bromés dont l'HexaBromoCycloDoDecane (HBCDD), justifiant sa classification au niveau européen (système REACH) en tant que substance à très haut niveau de préoccupation et par la convention de Stockholm comme polluant organique persistant. L'homme est principalement exposé à l'HBCDD via l'alimentation et l'ingestion de poussières domestiques, l'exposition moyenne journalière en France étant estimée à 0,21ng/kg de poids corporel pour un adulte à plusieurs dizaines voire centaines de ng/kg chez le nouveau-né, le bébé et le jeune enfant. Alors que la neurotoxicité développementale de l'HBCDD a été récemment démontrée, ce projet se propose d'évaluer à présent les effets neurotoxiques d'une exposition périnatale à l'HBCDD et le rôle que cette exposition pourrait jouer en tant que facteur de susceptibilité dans un modèle expérimental de TSA induit par le VPA chez le rat. Le présent projet vise à développer et à caractériser un modèle de TSA chez le rat en s'appuyant sur le modèle reconnu du VPA pour l'autisme chez cette espèce animale, puis à évaluer les effets de l'exposition conjointe à l'HBCDD sur la pharmacocinétique du VPA et l'émergence des troubles neurocomportementaux de type TSA. Ce protocole expérimental objet de cette saisine vise ainsi (1) à évaluer chez le rat la pharmacocinétique du VPA à 3 niveaux de concentration, (2) à évaluer si une exposition répétée à l'HBCDD peut modifier la pharmacocinétique du VPA, et (3) à déterminer les modalités d'un modèle d'autisme induit par le VPA associé à une co-exposition à l'HBCDD. Ce projet d'une durée de 3 ans inclura un total de 80 rats femelles Wistar non gestantes, le but étant par la suite de transposer chez la femelle gestante le modèle de TSA ainsi défini. 72 animaux seront répartis en 6 groupes expérimentaux (n=12/groupe), 2 groupes recevant une dose unique de VPA (500 mg/kg) par voie i.p. après 12 jours d'exposition, les 4 autres étant administrés quotidiennement par voie orale (gavage) pendant 3 jours aux doses de 300 ou 500 mg/kg/jour. Dans ce cas, l'administration de VPA sera réalisée lors des 10e, 11e et 12e jour d'exposition à l'HBCDD. Que ce soit dans la condition VPA administré en i.p. ou par gavage, 3 des 6 groupes seront administrés avec une solution huileuse d'HBCDD à la dose de 100 ng/kg/jour pendant 12 jours, les 3 autres groupes recevant au cours de la même période un volume équivalent de l'huile utilisée comme véhicule qui sera de l'huile d'avocat. Des prélèvements sanguins nous permettront de suivre la cinétique de l'HBCDD et du VPA sur 9 points sélectionnés durant les 18 heures qui suivent l'administration du VPA. Les animaux seront ensuite mis à mort selon les recommandations éthiques, à deux temps différents au cours de la cinétique (4h et 8h, 5 animaux à chaque temps) afin de prélever les organes d'intérêts en vue de réaliser des dosages de VPA dans ces tissus. Les 2 rats survivants seront utilisés pour réaliser les prélèvements à 18h avant d'être mis à mort et les organes prélevés en vue d'explorations ultérieures. L'ensemble des données sera intégré pour permettre la construction et la validation d'un modèle pharmacocinétique du VPA dans un contexte de co-exposition à l'HBCDD. Les données cinétiques qui seront alors produites par le modèle permettront alors de modéliser les interactions entre ces 2 composés dans la perspective de développer un modèle de TSA induit par le VPA et d'établir le caractère de susceptibilité pour le développement de ce trouble de l'exposition à l'HBCDD. Les rats femelles seront hébergés par 3 dans des cages ouvertes de 1300 cm² de surface, 18 cm de hauteur, l'eau et la nourriture étant disponibles ad libitum. Les cages seront maintenues dans des conditions d'hébergement contrôlées (température 22+/-2°C, humidité 55+/-5%, cycle lumineux 12h/12h, lumière allumée à 8h). Le milieu sera enrichi avec des feuilles de papier absorbant de manière à éviter le grignotage des matières plastiques des objets habituellement utilisés qui contiennent des substances de toute sorte pouvant interférer avec l'HBCDD. Les animaux seront surveillés et les points limites suivants relevés (diminution de la consommation alimentaire et hydrique,

baisse du poids corporel, modifications de l'apparence physique externe et du comportement de l'animal). Si l'un de ces points limites vient à apparaître, l'animal sera isolé et surveillé, voire mis à mort selon une méthode réglementaire (injection létale) en cas de persistance de l'état de mal-être de l'animal. Ce travail nécessite le recours à l'animal entier mimant la complexité de l'organisme pour pouvoir modéliser au plan cinétique le devenir de l'HBCDD et du VPA de manière à établir une possible interaction d'ordre pharmacocinétique entre les 2 composés (Remplacement). Le nombre d'animaux prévu pour cette étude est de 80. 72 rats seront utilisés pour l'expérience proprement dite, nombre estimé juste nécessaire et suffisant pour garantir la qualité des résultats tout en minimisant le nombre d'animaux qui sera utilisé pour l'expérience (Réduction et Raffinement). Huit rats supplémentaires seront réservés à la formation aux gestes techniques des personnels certifiés qui vont participer à l'expérience par des personnes formatrices en expérimentation animale ayant l'habilitation et la compétence pour ces gestes techniques (Raffinement), animaux qui seront maintenus en vie et pourront être réutilisés dans le cadre d'autres projets de formation (Raffinement).

16222 Si les antibiotiques ont profondément transformé la médecine du 20ème siècle, leur utilisation généralisée a conduit à l'apparition puis à la dissémination de bactéries résistantes. Dans le même temps, l'effort de recherche de nouveaux antibiotiques s'est effondré. Apparaissent ainsi aujourd'hui des bactéries résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Les infections sont donc de plus en plus difficiles à contrôler, et les traitements standards de moins en moins efficaces. Dans ce contexte, la mise au point de nouveaux composés anti-infectieux est critique et encouragée par les organisations telles que l'OMS, et les Center for Disease Control and Prevention américain et européen.

Ce projet vise précisément à caractériser de nouveaux anti-infectieux ciblant les bactéries.

De tels composés sont préalablement conçus et caractérisés *in vitro* avec pour objectifs d'optimiser leur originalité, leur puissance, leur spectre d'action, et leur fenêtre de sécurité. Ces batteries de tests *in vitro*, utilisant des enzymes isolées, des bactéries et des cellules isolées permettent de ne retenir que les composés suffisamment puissants et les moins toxiques. Ces données ne suffisent malheureusement pas pour envisager une administration chez l'homme : leur efficacité et leur toxicité éventuelle sont la résultante des interactions complexes dans un organisme vivant, entre autres, entre le médicament, la bactérie, le système immunitaire de l'hôte, son système de métabolisation et d'élimination. Cet ensemble complexe d'interactions doit être analysé chez l'animal avant une éventuelle administration chez l'homme.

La pharmacologie *in vivo* dans le domaine des antibiotiques a exploré de nombreux modèles animaux, permettant de modéliser différents types d'infections locales ou généralisées, et causées par différents types de bactéries. Il apparaît que la souris est un animal permettant de modéliser la plupart des infections et permet de générer des données d'efficacité très prédictives de celles qu'un antibiotique aura chez l'homme. L'avantage majeur de cet animal est sa petite taille qui permet, au stade recherche, de travailler avec des quantités de candidat médicament faibles, comme c'est souvent le cas. Dans certains cas, le rat peut être préféré, sa plus grande taille autorisant des analyses plus fines.

Afin d'évaluer l'effet thérapeutique de ces molécules, nous avons besoin de modèles d'infection chez le rongeur couvrant différentes voies d'infection (bactéries dépendantes), et différentes voies de traitement (composés dépendantes). Nous étudierons donc la toxicité et l'efficacité de nouveaux composés chez la souris et le rat adultes. Sur les 5 ans du projet, nous prévoyons d'utiliser au maximum 38500 animaux à raison de 90% de souris et 10% de rats. La tolérance des rongeurs aux composés sera évaluée dans un premier temps sur un nombre minimal d'animaux (1000 sur 5 ans, 250 produits testés). A ce stade, les composés toxiques sont éliminés. L'efficacité des composés bien tolérés peut alors être évaluée dans des modèles d'infection dont l'objectif est de mesurer leur efficacité à réduire voire stopper la progression et les effets délétères de l'infection bactérienne. Afin de permettre une analyse statistique fiable, 4 à 10 animaux par groupe sont alors requis en fonction de la bactérie, de son mode d'infection, du type d'effet attendu. Nous prévoyons un maximum de 150 tests annuels, utilisant chacun au maximum 50 animaux par test.

Le nombre total d'animaux utilisés doit permettre de caractériser sur les 5 années de la durée du projet les candidats antibactériens issus de notre recherche, et de sélectionner les meilleurs pour les faire progresser vers les phases cliniques.

Le projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. Les animaux sont hébergés dans des conditions répondant à leurs besoins, avec des enrichissements de milieu, et manipulés délicatement. Ils font l'objet d'observations quotidiennes. Une grille d'observation des signes cliniques et l'arbre décisionnel correspondant sont mis en place afin de limiter la douleur, d'optimiser le bien-être animal et de pratiquer au plus tôt un sacrifice éthique.

Un traitement analgésique sera envisagé si nécessaire pour certaines procédures.

16223 L'équipe tente d'étudier, de comprendre, d'améliorer et de mettre en œuvre par des études précliniques, dans des modèles animaux, de nouvelles stratégies vaccinales contre les infections virales ou bactériennes, et s'efforce de transférer ses connaissances vers des études cliniques chez l'homme. Notre projet comporte deux volets reliés entre eux: la compréhension des réponses immunitaires aux vaccins et le développement de nouvelles stratégies de vaccination. En effet, le développement de nouvelles stratégies vaccinales dépend de l'état de nos connaissances des mécanismes de la réponse immunitaire contre les infections et les vaccins.

La thématique de recherche est principalement centrée sur l'étude du rôle des réponses cellulaires T et B, cruciales dans la lutte contre certaines infections virales ou bactériennes. Notre centre d'intérêt se porte également sur l'étude des étapes initiales de la réponse immunitaire, qui conditionnent l'efficacité de celle-ci.

Cependant des contraintes éthiques et financières rendent difficile l'étude de l'ensemble de ces mécanismes chez l'homme. Les différents modèles murins utilisés nous offrent la possibilité de décortiquer l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu lors d'une réponse immunitaire. Les souris conventionnelles (BALB/c et C57Bl6) et transgéniques (Langerin-DTR-GFP; Knock-out (KO) pour récepteurs chimiokines) nous permettent d'avoir une connaissance approfondie des mécanismes de la réponse immunitaire. L'ensemble du projet prend en compte la règle des 3R. Des tests *in vitro* sur cellules humaines ont été réalisés auparavant pour évaluer la non toxicité des vaccins utilisés, mais l'efficacité immunologique n'est réalisable que chez des êtres vivants. Nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles et les utilisateurs afin de réduire le nombre d'animaux et le nombre de groupes contrôles. Nous améliorons au maximum nos protocoles pour maîtriser la souffrance des animaux ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découler. Les animaux sont hébergés dans les conditions d'hébergement et d'enrichissement adéquates de notre établissement avec un personnel dédié au soin et à l'expérimentation. Sur l'ensemble du projet (5 ans), et en prenant en compte la règle des 3R, nous utiliserons environ 585 souris, toutes lignées confondues.

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

16224 Le trouble dépressif majeur fait partie des maladies mentales invalidantes les plus fréquemment diagnostiquées. Les traitements médicamenteux actuels basés sur la prise d'antidépresseurs restent insatisfaisants car il faut souvent attendre 3 à 4 semaines pour en ressentir les premiers effets bénéfiques. Il est donc urgent de développer de nouveaux traitements antidépresseurs à action rapide et efficaces. Les patients dépressifs souffrent de troubles des rythmes biologiques et notamment de perturbations du rythme veille/sommeil et il est démontré chez ces patients que, réciproquement, les troubles du sommeil concourent en au développement de leur dépression. Chez les mammifères, les rythmes biologiques sont générés par un réseau d'horloges localisé dans le cerveau et notamment dans les structures régulant l'humeur qui forment le système limbique. Ces horloges ont un fonctionnement rythmique proche de 24H et sont donc appelées horloges circadiennes. Le projet proposé ici pose alors deux questions : (1) comment les horloges circadiennes notamment celles du système limbique influence la physiopathologie de la dépression et réciproquement et (2) de savoir si

des interventions thérapeutiques innovantes ciblant le fonctionnement de ces horloges pourraient traiter la dépression et alors d'identifier par quels mécanismes d'action moléculaire et cellulaire.

Dans un premier temps, le projet vise à identifier dans un modèle de stress chronique induisant chez l'animal une dépression comment le stress va influencer le fonctionnement des horloges circadiennes des structures du cerveau régulant l'humeur. Pour cela, l'expression rythmique de gènes d'horloge spécifiques au fonctionnement moléculaire de ces horloges sera analysée. Ensuite, nous prévoyons de moduler directement le fonctionnement de ces horloges en invalidant par injection virale intracérébrale l'expression de certains de ces gènes d'horloges cibles et d'analyser alors les conséquences sur la réponse au stress chronique. Puis, il s'agira de tester de nouvelles pistes thérapeutiques pour la dépression et d'en analyser les conséquences sur le fonctionnement moléculaire des horloges régulant l'humeur. Pour cela, (1) nous modulerons par approche pharmacologique le fonctionnement moléculaire de ces horloges et (2) nous testerons les effets d'une injection unique de kétamine agent anesthésiant qui, utilisé à faible dose, présenterait un effet anti-dépresseur rapide et durable qui pourrait affecter le fonctionnement des horloges circadiennes limbiques. De plus, sachant que la privation de sommeil constitue une thérapie alternative intéressante pour normaliser les troubles de l'humeur, nous étudierons finalement le rôle joué par les horloges régulant l'humeur dans l'action antidépresseur de la privation de sommeil.

Ce projet sera conduit sur une période de 5 ans et inclura l'utilisation de 463 souris. Il fournira des informations précieuses concernant les facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans la neurobiologie de la dépression.

Le projet sera réalisé en accord avec les exigences de la règle des 3 R.

Remplacement: La recherche sur la dépression implique l'analyse de circuits neuronaux intégrés et complexes impliquant plusieurs régions cérébrales interconnectées. La complexité de ces circuits ne peut à l'heure actuelle être reproduite *in vitro* ou *in silico*. L'utilisation de l'animal reste donc indispensable.

Réduction: La taille des groupes a été estimée statistiquement et correspond au minimum requis pour permettre une analyse statistique fiable des résultats.

Raffinement: Les souris seront hébergées en groupe dans un milieu de vie approprié avec de la litière, des matériaux de nidification et des bâtons à ronger. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie appropriées et la température corporelle des animaux sera maintenue grâce à un tapis chauffant pendant toute la durée de ces procédures. L'état de santé des animaux sera ensuite évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Des points limites prédictifs et précoces seront établis permettant d'interrompre les procédures limitant ainsi la souffrance animale.

16225 La diminution d'efficacité des antibiotiques, du fait des résistances bactériennes qui se développent, oblige à mieux utiliser les antibiotiques en élevage notamment en administrant des doses optimales, c'est-à-dire suffisantes pour permettre la guérison sans contribuer à une surconsommation d'antibiotiques en médecine vétérinaire.

Pour éviter la surconsommation d'antibiotiques, le traitement préventif des animaux dès leur entrée dans le bâtiment d'élevage et avant qu'ils ne soient malades a été remis en question par le plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire (Ecoantibio). Il est en effet préconisé de traiter un animal ou un groupe d'animaux seulement lors de l'apparition de signes cliniques chez certains d'entre eux. Il est alors possible d'administrer soit un traitement individuel par voie injectable, soit un traitement collectif par voie orale. Or, s'il faut traiter un grand nombre d'animaux plusieurs fois par jour, le traitement individuel par voie injectable devient difficile à mettre en place et coûteux pour l'éleveur. Une alternative intéressante est alors de traiter les animaux aux antibiotiques par voie orale via l'eau de boisson, ce qui permet un traitement rapide et ciblé d'un lot d'animaux (traitement d'une loge, d'une salle ou de tout le bâtiment).

Dans l'optique d'optimiser le traitement aux antibiotiques via l'eau de boisson, il est nécessaire de connaître les concentrations en antibiotiques qui arrivent au site infectieux après l'administration par voie orale et donc de déterminer les concentrations plasmatiques en antibiotiques atteintes chez les animaux lors du traitement. Le but du projet sera alors de déterminer si l'administration de deux

antibiotiques largement utilisés en élevage porcin via l'eau de boisson permet d'atteindre des concentrations plasmatiques en antibiotiques suffisantes pour la majorité des porcelets en post-sevrage.

Le projet sera mené sur deux groupes de porcelets à des temps différents, chaque groupe comportant 102 porcelets soit 204 porcelets pour la totalité du projet.

Les deux groupes seront traités avec un antibiotique différent administré via l'eau de boisson toutes les 12h ou 24h pendant 72h en fonction des recommandations données dans le RCP (Résumé des Caractéristiques du Produit) de chaque antibiotique.

Pour les deux groupes, les 102 porcelets seront hébergés dans 6 cases comportant chacune 17 animaux. Dans toutes les cases, les consommations d'eau individuelles et par case de tous les animaux seront relevées quotidiennement par des compteurs d'eau connectés équipés de lecteur de boucles RFID de chaque porc. La concentration en antibiotique dans l'eau de boisson sera mesurée au laboratoire suite à un prélèvement d'eau à l'abreuvoir. Dans seulement trois cases, des prélèvements sanguins seront réalisés sur les porcelets pour déterminer les concentrations plasmatiques en antibiotiques (au maximum 4 prises de sang par animal, 1 prise de sang par jour pendant 4 jours).

Pour chaque temps de prélèvement, 24 ou 27 porcs seront prélevés (la moitié de chacune des 3 cases de 17 porcs) car une grande variabilité interindividuelle est attendue compte-tenu du fait que les animaux n'ont pas tous le même poids, ne consomment pas tous les mêmes quantités d'eau au même moment, n'ont pas tous le même statut sanitaire, etc.

Il n'est pas possible de remplacer totalement l'utilisation des animaux dans ce projet. En effet, il n'est tout d'abord pas possible de déterminer par d'autres moyens les consommations d'eau des animaux dans des conditions d'élevage. De plus, 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 (absorption, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale, ...).

Cependant, des expérimentations menées précédemment en atelier d'engraissement ovin ont montré que le prélèvement de seulement la moitié des animaux était suffisant mais nécessaire pour bien caractériser la variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques liée à la variabilité des comportements d'abreuvement des animaux, ce qui nous permet de réduire le nombre d'animaux subissant une procédure « modérée ». Les données obtenues dans ce projet permettront également de construire un modèle pharmaco-statistique afin de prédire les concentrations plasmatiques qui seront réellement observées chez les porcs en élevage. Un tel modèle permettra à terme de prédire, pour n'importe quel antibiotique, l'impact du comportement individuel d'abreuvement sur l'exposition plasmatique à l'antibiotique et de proposer des schémas thérapeutiques adaptés à la spécificité du comportement de l'animal quelle que soit l'espèce étudiée, sans avoir besoin de réaliser à nouveau des expérimentations sur animaux.

Enfin, il n'est pas possible de raffiner autant les conditions d'hébergement des animaux que dans une animalerie de laboratoire car nous souhaitons rester proche des conditions d'élevage. Cependant, pour éviter tout stress ou douleur à l'animal, la contention des animaux ainsi que les prélèvements seront réalisés par du personnel formé plus particulièrement à la manipulation des porcelets et habitués à la manipulation d'animaux d'élevage (moins d'habituations possibles aux manipulations répétées que pour les animaux d'expérimentation). Les animaux ne seront jamais isolés pour éviter tout stress de séparation du groupe.

16226 La maladie d'Alzheimer (MA) est la première cause de démence mondiale. Les patients atteints présentent une détérioration progressive et irréversible de leurs fonctions cognitives qui les prive de leur autonomie. Malheureusement, aucun traitement efficace, préventif ou curatif, n'existe à ce jour. Elle représente donc un enjeu majeur de santé publique. C'est une maladie multifactorielle dont les causes restent mal comprises, cependant nous savons aujourd'hui que les maladies cardio-vasculaires et notamment l'hypertension sont des facteurs de risque majeurs pour son développement.

Par ailleurs, le diagnostic tardif de la maladie freine l'avancement de la recherche de traitements efficaces. Aujourd'hui, ce sont les premiers symptômes de déclin cognitif qui déclenchent le diagnostic, alors qu'ils apparaissent plusieurs années après le début de la maladie. Il est donc indispensable de

développer des outils permettant un diagnostic précoce. La MA et l'hypertension ont une caractéristique commune : bien avant d'être malades, les patients présentent une modification de leur circulation sanguine cérébrale, mais ce biomarqueur n'est pas encore utilisé en clinique.

L'imagerie échographique est un outil de choix car elle est non-invasive, peu coûteuse, facile à mettre en place et permet une imagerie très précise des flux sanguins. Cependant, la boîte crânienne bloque le passage des ultrasons il est donc compliqué d'imager le cerveau humain par échographie. Notre but, à long terme, est de contourner cet obstacle et de détecter ces altérations vasculaires par imagerie échographique non-invasive de la rétine.

Les objectifs de ce projet sont donc, pour chacune des deux maladies :

1- Trouver des biomarqueurs vasculaires cérébraux précoces sur chaque modèle animal par imagerie ultrasonore.

2- Suivre l'évolution de ces biomarqueurs à différents stades au cours du développement de la maladie.

3- Les détecter de manière totalement non-invasive : en imageant l'œil (les vaisseaux sanguins rétinien) afin de les transposer au patient humain. En effet, la rétine fait partie du système nerveux central, à ce titre c'est un prolongement du cerveau.

Le but ultime est de proposer un nouvel outil pour étudier les mécanismes de la MA et à terme la diagnostiquer de manière précoce et non-invasive.

Cette étude nécessitera au maximum 170 rats. Deux modèles seront utilisés : un modèle transgénique d'Alzheimer et un modèle d'hypertension spontanée. De plus, trois groupes de d'âges différents seront étudiés pour Alzheimer, deux pour l'hypertension.

Tout sera mis en œuvre pour que le projet s'inscrive pleinement dans les 3R et respecte le bien-être animal :

- Il nous est malheureusement impossible de remplacer l'animal car nous avons besoin d'un système biologique intègre du cerveau et de l'œil pour la mesure des activités cérébrale et rétinienne.

- Le nombre d'animaux est réduit au minimum par une estimation statistique préalable afin d'obtenir des résultats significatifs avec le moins d'animaux possible.

- Le raffinement sera pratiqué durant toute la durée du projet : les animaux seront hébergés par deux avec enrichissement du milieu. La technique d'imagerie utilisée est minimalement invasive et les séances seront pratiquées sous anesthésie générale. Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être.

16227 L'infertilité est un enjeu majeur de santé publique défini, par l'organisation mondiale de la santé. L'incidence de troubles de la fertilité a régulièrement augmentée ces dernières décennies. Des études utilisant des modèles animaux ainsi que des études épidémiologiques ont montré que des expositions à des polluants, herbicides et/ou pesticides peuvent altérer la physiologie testiculaire et prédisposer à une infertilité à l'âge adulte. Ainsi, les périodes foetales et néonatales sont aujourd'hui définies comme les périodes les plus sensibles à l'exposition des substances chimiques présentes dans l'environnement, appelées xénobiotiques. Ces molécules toxiques peuvent toutefois être éliminées par l'organisme grâce à des mécanismes de détoxification. Les récepteurs nucléaires Constitutive Androstane Receptor (CAR/Nr1i3) et Pregnane X Receptor (PXR) font partie des acteurs impliqués dans le contrôle du catabolisme des xénobiotiques. Aussi ce projet vise à analyser les rôles des récepteurs PXR et CAR dans la physiologie et les physiopathologies testiculaires, notamment dans le contexte de l'exposition aux xénobiotiques. Pour cela nous travaillerons avec des souris de la lignée C57Bl6 invalidées pour CAR ou PXR exposées ou non à des combinaisons de xénobiotiques. Nous focaliserons sur les périodes in utero et néonatales qui sont des périodes clés du développement testiculaire pour la mise en place de la physiologie adulte de l'organe mature et donc la fertilité. Les mères gestantes seront traitées pendant les deux derniers tiers de la gestation. Puis les nouveaux nés seront traités par injection sous cutanée pendant les 15 premiers jours de leur vie. Cette demande de projet s'étend sur 4 ans. Pour chaque groupe, nous prévoyons 5 femelles par groupes ($5 \times 12 = 60$ femelles). Nous obtiendrons environ 420 petits (mâles et femelles) et seulement les mâles seront injectés en période néonatale.

Au final, ce projet utilisera environ 500 animaux (mères et petits des deux sexes). L'analyse de ces échantillons permettra de définir les mécanismes moléculaires sous-jacents modulés par les signalisations CAR ou PXR et pouvant participer à l'étiologie de pathologies testiculaires résultant en une atteinte de la fertilité.

L'ensemble de ce projet s'intègre au mieux dans le respect de la règle des 3R. Le remplacement par des approches alternatives n'est pas possible car aucune approche ne permettrait d'analyser l'impact à long terme sur la fertilité à l'âge adulte suite à une exposition néonatale aux xénobiotiques puisque cela nécessite un modèle vivant intégré. Cependant, dans une logique de réduction du nombre d'animaux, nous avons calculé au plus juste le nombre d'animaux utilisés, de façon à obtenir des données statistiquement valides.

Le raffinement reposera sur un hébergement et une surveillance des animaux ainsi que l'élaboration de protocoles prenant en compte au maximum le bien être animal. Ce reposera notamment avec un enrichissement des cages (tunnel en carton et maisons à souris) d. Les souris seront hébergées en groupes sociaux avec des tailles de cages conformes à la législation en fonction du nombre de souris.

16228 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-spinal (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 pronostiques.

Or, il s'agit de la tumeur intracérébrale qui a le plus de propension à donner des métastases, présentes dans 30 à 35% des cas, au niveau du système nerveux central sous la forme de nodules au niveau de l'encéphale et/ou du névraxe ou d'une méningite tumorale.

Le traitement standard actuel comprend la chirurgie, la chimiothérapie et/ou radiothérapie. Bien que ces traitements améliorent la survie, les chances de guérison restent faibles, en particulier pour les formes à haut risque en raison de récurrences ou de métastases à l'intérieur ou voire à l'extérieur même du système nerveux central.

Le développement d'outils d'imagerie adaptés est capital dans la mesure où ils permettent un diagnostic fiable et précoce de la pathologie et assurent la visualisation de l'étendue de la maladie. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) des régions encéphaliques et cervico-dorso-lombaires constitue la technique de référence pour le diagnostic du médulloblastome. Cependant, son application en Recherche Préclinique, notamment sur des animaux de petite taille comme les rongeurs constitue un réel obstacle de par son manque de résolution. Ainsi, la présence de micro-foyers tumoraux d'origine métastatique peuvent ne pas être détectés chez la souris. Un autre type de bilan pré-chirurgical en cas de médulloblastome constitue la « cytologie du LCR » avec nécessité de savoir ponctionner ce fluide sans altérer les fonctions de l'animal.

C'est pourquoi, nous nous sommes tournés vers l'imagerie par bioluminescence. En effet, notre plateforme dispose d'une caméra permettant de visualiser et d'analyser le signal émis par les cellules tumorales transfectées nécessaires à l'utilisation de ce type d'appareillage. L'avantage associé à cette technique d'imagerie réside dans le fait qu'elle est non invasive, très résolutive, accessible et rapide à effectuer.

Nous proposons de mettre en place un modèle « *in vivo* » sur des souris femelles nude via une injection intrathécale (sous l'arachnoïde) de cellules afin de proposer un modèle plus pertinent. En effet, une étude préliminaire basée sur une injection stéréotaxique dans le cervelet, nous a permis de caractériser cette tumeur mais a aussi soulevé les limites de cette méthode, à savoir un manque de dissémination dans les voies lepto-méningées pouvant être à l'origine de l'échec des armes thérapeutiques.

Afin de mettre en place et de caractériser ce modèle *in vivo* de tumeurs de médulloblastome reflétant la pathologie décrite dans les cas cliniques (voies de dissémination similaires, foyers multiples...), l'imagerie par bioluminescence se révèle être l'outil d'imagerie le plus approprié.

Dans ce cadre, l'étude préclinique sera réalisée sur 15 souris au maximum.

Une première étude « *in vitro* » a déjà été menée afin d'apporter une validation de concept et d'optimiser au mieux l'utilisation de l'imageur et des logiciels associés (REPLACEMENT), le but étant d'établir un protocole expérimental pertinent sur des lignées cellulaires tumorales transfectées. Nous devons maintenant évaluer la stratégie *in vivo*. Le REPLACEMENT des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans notre contexte : l'utilité même d'une caméra à bioluminescence est de permettre un suivi *in vivo*.

A cet effet, la mise en place de ce modèle sera réalisé sur 15 souris femelles nude. L'évaluation de la cinétique de croissance tumorale sera évaluée par un suivi longitudinal des animaux par Imagerie par Bioluminescence permettant de réaliser les examens dans le temps sur un même animal et ainsi de réduire le nombre d'animaux (REDUCTION).

Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes seront effectuées (implantation de la tumeur, imagerie). En outre, les animaux seront mis à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (RAFFINEMENT) comme l'apparition d'altérations fonctionnelles (troubles de la locomotion, de l'équilibre, tremblements) ou de son comportement (surexcitation). La durée de l'étude ne dépassera pas 5 semaines. Le suivi par imagerie de bioluminescence permettra de déterminer l'évolution tumorale et d'anticiper l'expérimentation précocement avant l'apparition d'éventuels symptômes.

16229 Les maladies chroniques du foie sont fréquentes. Par exemple, on estime qu'il y a en France environ 700'000 malades atteints de cirrhose. La stéatohépatite non alcoolique (ou NASH) est l'une des principales causes de l'apparition des maladies chroniques du foie comme la cirrhose ou le cancer du foie, et est souvent associée au syndrome métabolique, qui est défini comme la présence de plusieurs anomalies métaboliques (obésité abdominale, diabète, hypertension, taux faible de "bon" cholestérol et élevé de lipides dans le sang). La NASH est définie par l'accumulation excessive de lipides dans le foie (stéatose), d'une mort excessive des cellules du foie (les hépatocytes), d'une inflammation hépatique avec ou sans fibrose (apparition de tissu cicatriciel dans le foie, prélude de la cirrhose). Aucun agent thérapeutique efficace n'est actuellement disponible pour la NASH. Plus généralement, les mécanismes responsables de la progression des maladies du foie vers la cirrhose et ses complications comme le cancer du foie, restent incomplètement compris. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait d'identifier de potentiels traitements.

Les cellules qui bordent la face interne des vaisseaux sanguins du foie sont des cellules endothéliales et forment dans leur ensemble l'endothélium hépatique. Bien que leur rôle soit mal élucidé, elles semblent importantes dans des processus-clé que sont la progression de la fibrose et du cancer du foie.

Nos travaux préliminaires indiquent que les protéines FXR, TGR5 et PN1 sont fortement diminués dans les cellules de l'endothélium hépatique des souris qui ont été mis sous un régime riche en matières grasses par rapport aux souris contrôles. De plus, il a été déjà démontré que PN1 protège contre l'inflammation et la fibrose pulmonaire, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle similaire dans les maladies du foie. PN1 est une protéine qui régule la relation des processus de coagulation et inflammation, processus dans lesquelles FXR et TGR5 sont aussi impliqués. Ces deux protéines jouent des rôles importants dans la régulation de processus essentiels pour le bon fonctionnement des cellules et il est connu qu'ils jouent un rôle bénéfique dans d'autres types cellulaires hépatiques.

Objectifs du projet :

Comprendre le rôle de l'endothélium hépatique dans les maladies chroniques du foie telles que la NASH et la cirrhose, et particulièrement le rôle de FXR, TGR5 et PN1.

Rationnel pour l'utilisation d'animaux :

Il n'existe pas de modèle *in vitro* reproduisant de manière fiable la NASH ou la cirrhose. L'utilisation de modèles animaux est donc essentielle. C'est vers des modèles de souris que se porte notre choix car des souris transgéniques existent permettant de supprimer spécifiquement des processus cellulaires liés à l'activité de FXR, TGR5 et PN1 dans certains types cellulaires ou dans toute la souris.

Protocole expérimental :

Des lignées de souris présentant une déficience en l'expression de ces trois protéines seront créées ; les souris qui auront une protéine supprimée dans l'endothélium subiront une greffe de moelle osseuse après irradiation dans un irradiateur à rayons gamma pour obtenir un modèle plus pertinent et donc des résultats plus fiables car cette procédure permet d'éliminer un problème inhérent à la suppression de protéines dans l'endothélium : des contaminations venant d'autres types cellulaires. L'irradiation en soi ne cause pas de douleur ; cependant les symptômes pénibles de la « maladie de l'irradiation » seront autant que possible mitigés par l'adaptation des soins (présence de nourriture amollie et d'eau en gel facilement accessible au fond de la cage, suivi quotidien du niveau d'hydratation, administration d'antibiotiques pour prévenir les infections). Les souris seront alimentées avec des régimes alimentaires spécifiques (régime gras ou régime déficient en certains nutriments) afin de provoquer une NASH, ce qui nous permettra d'évaluer le rôle de l'endothélium dans le développement de cette maladie. D'autres souris seront injectées de façon intrapéritonéale avec un agent provoquant l'apparition d'une fibrose hépatique, afin d'évaluer le rôle des cellules endothéliales dans son développement. Au cours de ces expériences, du sang sera prélevé sur certaines souris vigiles pour nous permettre de suivre l'évolution de leurs paramètres biologiques. Dans un troisième temps, le potentiel thérapeutique de l'activation de l'expression de FXR et TGR5 sera évalué en stimulant ce processus chez des souris atteintes de maladie du foie par injection intrapéritonéale ou par gavage, approche qui pourrait ensuite être transposée à l'être humain si elle se révèle efficace. L'ensemble des procédures durera entre 6 semaines et 26 semaines au total selon le groupe auquel appartient l'animal. A la fin des procédures, les souris seront euthanasiées.

Mesures prises pour remplacer le modèle souris, réduire le nombre de souris utilisées ou améliorer les conditions de vie des animaux :

Des expériences *in vitro* sur cellules en cultures ont été et seront effectuées avant toute expérience animale dans le but de seulement valider chez l'animal ce qui aura été identifié *in vitro*. Ceci permettra donc de réduire le nombre d'animaux qui sera utilisé. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet a été calculé de manière à minimiser le nombre de souris tout en assurant des résultats robustes scientifiquement et statistiquement. Les souris témoin qui constitueront les groupes contrôles seront utilisées dans différents protocoles dans la mesure du possible.

Tous les animaux qui seront utilisés dans ce projet seront surveillés quotidiennement et toutes les mesures nécessaires à leur bien-être seront prises (bâtonnets en bois et cotons). De même, toutes les mesures en vue de réduire la souffrance, le stress ou l'angoisse seront prises si un animal présente un de ces signes : des antalgiques seront administrés si une douleur est détectée et les interventions douloureuses (injections intra-veineuses, euthanasie en fin de protocole) se feront sous anesthésie. Pour chacune des procédures, des mesures à suivre en cas de détection de douleur ou de détresse ont été définies de façon détaillée (exemples : administration d'antalgiques, sortie de procédure, arrêt des expériences). Des points limites représentant un seuil de détresse fixé à l'avance adapté à chaque procédure ont également été définis. Si l'un des animaux atteint l'un de ces points limites, il sera euthanasié. Ce projet se déroulera sur cinq ans et nécessitera 6100 souris. A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre la physiopathologie des maladies du foie et d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de ces maladies qui souffrent du manque d'agents thérapeutiques efficaces.

16230 Chaque année, les pertes céréalieres totales liées à la consommation directe par les rongeurs ou à la dégradation due à leur excréta, seraient de l'ordre de 10% de la production mondiale. Les rongeurs constituent un réservoir de plus de 40 zoonoses, tuant des milliers de personnes chaque année à travers le monde. Le contrôle de leur prolifération semble donc constituer un enjeu majeur de santé publique. L'objectif est de tester l'efficacité et la sécurité de nouvelles molécules pour le contrôle des populations de rongeurs.

Des études bibliographiques, *in silico* et *in vitro* permettront de sélectionner les molécules d'intérêt. Néanmoins, seul l'expérimentation sur modèle animal concerné, rats et souris, permettra de démontrer l'efficacité de ces substances et leur faible rémanence tissulaire (en particulier hépatique). Cette faible

rémanence tissulaire est indispensable afin d'éviter les contaminations des espèces non-cibles prédatrices de rongeurs via la chaîne alimentaire.

Nous réduirons au maximum le nombre d'animaux en expérimentation. Un minimum de 10 animaux (rats ou souris) par groupe sera requis pour évaluer l'efficacité d'une nouvelle molécule afin de disposer d'un test avec une puissance statistique satisfaisante tandis qu'un minimum de 24 animaux (rats ou souris) sera requis pour évaluer la rémanence tissulaire (hépatique) de cette même nouvelle molécule et déterminer ses paramètres pharmacocinétiques. 34 animaux minimum est le nombre d'animaux minimum nécessaire pour obtenir les résultats relatifs à l'efficacité et à la rémanence d'une nouvelle molécule. Sur 5 ans, nous envisageons d'utiliser 3060 rongeurs, soit 2040 rats et 1020 souris pour nous permettre d'évaluer 20 nouvelles molécules.

Nous raffinerons la méthodologie effectuée, ce qui implique la notion de points limites.

Toute observation de prostration avancée, d'hémorragies importantes, de pâleur extrême des muqueuses, d'une perte de poids importante, de déshydratation, de signes convulsifs et autres signes cliniques que nous pourrions définir au cours des études sera considérée comme un point limite et conduira à l'euthanasie des animaux. Les animaux seront conservés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être et leurs besoins sociaux. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et qualifié afin de limiter au maximum le stress et la souffrance causée par les tests

16231 Lorsque les artères des membres inférieures se bouchent, les muscles qu'elles irriguent ne reçoivent plus suffisamment de sang et donc d'oxygène. C'est ce qu'on appelle l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Au fil de l'évolution de cette pathologie, les douleurs des jambes se font de plus en plus persistantes, jusqu'à atteindre le stade final de la maladie : le stade d'ischémie permanente où les muscles de la jambe meurent. Le traitement est habituellement chirurgical et vise à rétablir un apport suffisant de sang dans les membres inférieurs, soit en dilatant les artères bouchées, soit en implantant des tubes prothétiques qui joueront le rôle de nouvelles artères. Néanmoins, l'évolution de cette maladie se fait souvent vers l'ischémie permanente, et ce malgré le recours aux traitements chirurgicaux. L'amputation d'une partie ou de l'intégralité du membre inférieur est alors la seule option que l'on peut proposer à ces patients.

De nouvelles thérapeutiques semblent donc nécessaires, et les thérapies de régénération musculaire par les cellules constituent une voie d'intérêt. Les essais où l'on injecte des cellules capables de régénérer les muscles, montrent de bons résultats. Ces bons résultats sont vraisemblablement imputables aux substances secrétées par ces cellules. Ces substances semblent capables de stimuler les mécanismes de régénération du muscle. Elles sont regroupées dans de petites particules libérées par les cellules, appelées vésicules extracellulaires, qui pourraient être les médiateurs des effets bénéfiques des cellules greffées.

Ce projet s'ordonne donc autour de la question suivante : les vésicules secrétées par ces cellules peuvent-elles stimuler la régénération des muscles souffrant d'un déficit d'apport en sang ? Pour tenter d'y répondre, ce projet consistera à administrer ces vésicules à un modèle animal présentant une ischémie de patte.

Pour répondre à cette question, le schéma expérimental de base sur l'animal est le suivant : création d'une ischémie de la patte chez la souris par chirurgie, confirmation de l'atteinte vasculaire par doppler, administration du traitement par injections peu invasives intra-musculaires ou via une pompe osmotique à 7 jours, évaluation de la vascularisation par observation clinique et par doppler de façon hebdomadaire puis par angiographie à 21 jours, analyse microscopique d'échantillons musculaires afin de déterminer l'efficacité et l'effet du traitement 2 semaines après son administration.

Afin de respecter la règle des 3R, un nombre optimal d'animaux est prévu. 30 souris nous permettront d'acquérir la technique chirurgicale. Ce groupe nous permettra également d'analyser la cinétique de régénération spontanée de notre modèle et de recueillir le plus d'informations possible sur la douleur secondaire à la procédure. 120 souris devraient être utilisées afin d'assurer un nombre d'animaux suffisants pour permettre une analyse statistique fiable et robuste. Ce nombre pourra être réajusté en fonction des résultats obtenus avec le 1er groupe de 30 souris. Au total donc, un nombre maximal de 150 souris pourrait être utilisé.

Les nouvelles stratégies par thérapie cellulaire ne peuvent être utilisées et évaluées que *in vivo*. Les expériences sur l'animal sont donc justifiées avant leur application chez l'humain. En effet les mécanismes d'ischémie puis de régénération musculaire impliquent des phénomènes multiples (fibrose, inflammation, angiogénèse, recellularisation) et les études sur cultures cellulaires ne peuvent intégrer la complexité de ce phénomène.

Concernant le raffinement, de nombreux soins post-opératoires et un enrichissement des cages à l'animalerie seront mis en place afin de réduire la douleur et la souffrance et d'augmenter le bien-être des animaux. Un suivi rapproché des points limites sera mis en place pendant les premières 48h, et un passage quotidien sera réalisé tout au long de la vie de l'animal. Le geste chirurgical sera réalisé sous anesthésie, et des antalgiques seront administrés en systématique avant, et pendant les premières 48h. Au-delà de cette période, des antalgiques suffisants voire une euthanasie de l'animal, sont prévus en cas de persistance des douleurs ou de dépassement des points limites.

16232 De nombreux gènes régulateurs épigénétiques (GRE) sont fréquemment dérégulés dans les tumeurs. Parce que l'épigénome d'une cellule régule étroitement son identité et ses fonctions, les GREs représentent des candidats pour être des gènes « moteurs » de la plasticité du cancer conduisant à l'apparition du cancer et sa progression. Afin d'identifier ces gènes, un criblage génomique des 426 GREs connus sera effectué. Celui-ci permettra d'identifier les GREs induisant la capacité des cellules à développer des tumeurs lorsqu'elles sont injectées à des souris et les GREs permettant aux cellules d'acquérir des caractéristiques agressives telles que les métastases.

Cette étude fournit un cadre conceptuel pour identifier et caractériser les GREs fonctionnellement importants pour la progression tumorale et l'apparition de métastases. Les résultats obtenus prouveront l'importance d'événements qui précèdent ou conduisent à la progression des programmes tumoraux, et fourniront une base pour développer des nouvelles stratégies pour le traitement du cancer ainsi que pour le diagnostic précoce et la prévention.

Bien que les changements épigénétiques de l'ADN soient, en principe, réversibles et souvent sujettes à une intervention médicamenteuse, la promesse de cibler ces voies thérapeutiquement dans le cancer a été limitée par une compréhension incomplète des dépendances spécifiques du cancer aux GREs et à leurs altérations. Cet aperçu devrait s'avérer déterminant dans l'application clinique des GREs, en particulier compte tenu d'un intérêt croissant pour le développement de stratégies pronostiques et thérapeutiques. Le développement de médicaments capables de moduler des GREs spécifiques peut contourner la toxicité élevée et les effets secondaires des médicaments actuels peu spécifiques et offrir un outil puissant pour la médecine de précision. Par conséquent, les résultats de cette étude peuvent fournir une base pour des approches translationnelles visant à développer un traitement personnalisé.

Les deux premières procédures permettront l'identification de GREs jouant un rôle dans le développement de tumeurs mammaires, pour cela deux lignées cellulaires non-cancéreuses, dans lesquelles une perte de fonction des GREs est introduite, seront injectées dans des souris qui seront suivies pour un possible développement tumoral.

Afin de déterminer le pouvoir métastatique liée aux GREs deux autres lignées cellulaires ayant ou non été modifiées seront injectées dans les souris. La formation des métastases sera suivie par imagerie. Une étude pilote sera menée et suivant le résultat de cette dernière l'expérience pourra être élargie sur un plus grand nombre d'animaux afin de tester les différents GREs.

Au total pour toutes les expériences 270 souris seront nécessaires.

Les procédures qui seront réalisées ne peuvent pas être remplacées par des procédures performées *in vitro*. Toutes les expériences proposées sont essentielles. L'administration d'anesthésique et analgésique, 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.

Un suivi longitudinal par imagerie de la progression des métastases permet une réduction du nombre de souris. La réalisation séquentielle des expérimentations permet de réduire le nombre de souris, en effet la procédure 4 sera réalisée si et seulement si l'étude pilote (procédure 3) est concluante.

16233 Le projet vise à définir les conditions de réalisation d'études d'évaluation de l'effet pharmacologique de produits destinés à prévenir ou guérir les infections respiratoires chez le porc, dans un modèle induit d'infection respiratoire.

En élevage porcin, les maladies infectieuses respiratoires sont responsables d'une diminution du bien-être pouvant mener à la mort des animaux et de pertes importantes pour l'éleveur (retard de croissance ou mortalité, coût du traitement, temps passé à traiter les animaux). Les produits dont le développement est envisagé dans ce projet permettraient de limiter les conséquences d'une maladie et d'améliorer de façon notable le bien-être des animaux et le rendement de l'éleveur.

Dans le cadre de la recherche et du développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés au porc, les informations concernant l'efficacité d'un produit sont exigées par les autorités pour la constitution du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du produit final. Ces études doivent être conduites dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), des textes réglementaires et des lignes directrices correspondantes en vigueur.

La preuve de concept d'efficacité de nouveaux traitements doit être évaluée dans l'espèce cible lors d'un épisode clinique. L'espèce cible est ici le jeune porc.

L'utilisation d'un modèle induisant les signes cliniques et les lésions pulmonaires présents lors d'une infection respiratoire permet d'évaluer l'efficacité d'un traitement candidat dans des conditions réelles, telles que rencontrées sur le terrain. Cela permet d'améliorer les phases de screening de nouvelles molécules et de sélectionner plus vite et de façon plus sûre des molécules présentant une probabilité de succès importante pour être testées en situation clinique.

Plusieurs études pourront être requises. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la finalité de l'étude (preuve de concept d'efficacité, validation de l'effet pharmacologique d'un candidat...), la nature du produit testé et le stade d'avancement du produit. Les études réalisées dans le cadre de ce projet seront conduites séquentiellement et la chronologie des études sera définie de manière à obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires et ainsi d'optimiser le nombre d'animaux utilisés pour chaque nouvelle étude à partir des résultats précédents. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 400 animaux.

Tous les manipulations, traitements et prélèvements (sous anesthésie quand requis) seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU par du personnel compétent.

Les conditions d'hébergement permettront aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques et comportementaux.

Depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de la phase animale, les animaux seront suivis quotidiennement et si nécessaire soignés et/ou sortis de l'étude et euthanasiés pour leur éviter toute souffrance trop prolongée.

Les points limites seront, entre autres, toute altération sévère du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, comme l'anorexie prolongée, une altération sévère de la respiration, une léthargie, une perte de poids trop importante, une hypothermie ou hyperthermie par rapport à des seuils prédéfinis. Toute observation laissant présager un début de mal-être autre que celui dû à l'induction de la maladie, ou un mal-être induit par l'infection mais trop important et incompatible avec le respect du bien-être animal, sera immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra examiner l'animal et prendra les décisions adéquates pour le protéger.

Les animaux seront euthanasiés en fin de phase animale et une nécropsie sera réalisée pour évaluer l'étendue des lésions pulmonaires et réaliser des prélèvements.

Ce projet couvre également :

- le recueil de tissus ou organes pour évaluer les lésions macroscopiques de l'infection, l'efficacité des traitements et quantifier la présence du pathogène dans les organes concernés,
- le recueil de sang dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosages des échantillons générés dans ce projet,

- 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 méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques.

16234 Chez les bovins, la réalisation de constats de gestation précoces après insémination représente un élément essentiel pour un suivi de reproduction efficace du troupeau par l'éleveur. Aujourd'hui, les constats de gestation ne sont réalisables qu'environ 30 jours après fécondation que ce soit par échographie ou dosage sanguin d'une protéine associée à la gestation (PAG 1). Les programmes de recherche récemment menés ont permis d'identifier une autre famille de protéines associées à la gestation sécrétée par l'embryon dès le 16^{ème} jour après fécondation (PAG 11) qui pourrait permettre la réalisation de constats de gestation plus précoces, sous réserve qu'une méthode de dosage fiable soit développée. Ainsi, la présente demande vise à isoler et purifier 100 µg de PAG11 native pour les besoins de développement d'une méthode de dosage performante. Pour cela, 10 génisses seront superovulées puis inséminées en vue de la collecte non invasive d'embryons bovin au 15^{ème} jour après fécondation. Les embryons ainsi collectés seront cultivés *in vitro* pendant 24h et la PAG11 sera ensuite isolée du milieu de culture par des techniques de purification appropriées. Une à trois sessions de collectes d'embryons seront nécessaires pour obtenir les 100µg de PAG11 souhaités. Ce projet respecte la règle des 3R:

Remplacement: aucun modèle *ex vivo* ne permet à ce jour d'obtenir de la PAG11 d'une conformation identique à celle retrouvée biologiquement, la reproduction de l'ensemble des modifications post-traductionnelles n'étant pas possible autrement.

Réduction: compte-tenu des besoins en termes de production de PAG11, le protocole expérimental (notamment le traitement de superovulation) adopté permet de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés.

Raffinement : Avant de procéder aux collectes d'embryons, une phase d'habituation des génisses aux couloirs de circulation et aux cages de contention sera respectée. Les animaux seront manipulés dans le calme tout au long du projet. De plus, la procédure utilisée dans le cadre de ce projet est proche des techniques utilisées en élevage dans le cadre des activités de transfert embryonnaire et n'est susceptible d'engendrer qu'un faible stress ou de légères douleurs. Enfin, 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.

16235 Les cancers du pancréas, de la vessie, de l'ovaire et les métastases hépatiques d'origine colique font partie des cancers majeurs en France.

Le cancer pancréatique représente aujourd'hui la 4^{ème} cause de décès avec 12 000 victimes par an. Malheureusement, avec une recherche insuffisante ce cancer représentera bientôt la deuxième cause de mortalité par cancer.

Le cancer de la vessie représente le 2^{ème} cancer de l'appareil urinaire et 10 000 personnes sont touchées chaque année.

Le cancer colorectal représente le 3^{ème} cancer le plus courant en France. Après la survenue de ce cancer, des métastases sont observées dans 40 à 60% des cas. Environ 15% des cas engendrent des métastases hépatiques.

Le cancer de l'ovaire est au 5^{ème} rang des cancers féminins, la mortalité s'élève à 3500 femmes par an. Aux stades III et IV, ce cancer induit une carcinose péritonéale avec formation de nodules tumoraux dans le péritoine.

Le glioblastome est la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'enfant et le troisième chez l'adulte. Il y a environ 2500 nouveaux cas par an en France.

L'objectif de ce projet est de mettre en place différents modèles orthotopiques tumoraux afin d'évaluer l'efficacité de vecteurs oncolytiques pour ces cinq pathologies. 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 de greffes orthotopiques de cancers, différents virus oncolytiques exprimant des gènes thérapeutiques (virus « armés »). Un modèle orthotopique désigne l'implantation de cellules tumorales de différentes origines dans les organes correspondants, les souris développeront ainsi des tumeurs au site d'injection mimant ainsi de façon pertinente la réalité clinique humaine.

Les cancers ciblés correspondent aux tumeurs pour lesquelles il y a un fort besoin médical en clinique humaine.

De plus, sachant que le développement clinique de ces virus prévoit de les combiner avec de la chimiothérapie standard ou 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 agents de chimiothérapies standards ou 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 des substances à activité anti-tumorale.

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 chimiothérapie anticancéreuse.

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 anti-tumorale 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.

Après analyse de notre service de bio statistique, l'obtention de résultats statistiquement robustes est limitée à des groupes de 10 animaux. Cela est rendu possible par la réalisation des études par des techniciens rompus à ses manipulations, ce qui garantit une bonne reproductibilité des expériences et également un suivi optimal du bien-être des 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 3696 souris est envisagé pour ce projet.

-Raffiner : Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et dans un milieu de vie enrichie pour préserver les interactions sociales et leur permettre d'assouvir les comportements liés à leur espèce. Pour toutes les techniques le nécessitant, une analgésie et / ou une anesthésie est prévue dans le but de réduire à son minimum le stress et la souffrance des animaux.

Du fait de la combinaison avec nos virus, des doses sub optimales de chimiothérapies et anticorps sont utilisées, ce qui réduit fortement les effets secondaires habituellement observés avec ces traitements

Enfin, 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.

16236 Chaque année, les pertes céréalières totales liées à la consommation directe par les rongeurs ou à la dégradation due à leur excréta, seraient de l'ordre de 10% de la production mondiale. Les rongeurs constituent un réservoir de plus de 40 zoonoses, tuant des milliers de personnes chaque année à travers le monde. Le contrôle de leur prolifération semble donc constituer un enjeu majeur de santé publique. Ce contrôle est aujourd'hui effectué majoritairement par l'utilisation d'anticoagulants antivitamine K. Deux obstacles majeurs s'opposent et limitent leur utilisation, la résistance des rongeurs largement répandues chez le rat et leur écotoxicité majeure du fait de leur rémanence très forte. L'objectif de ce projet est de tester et sélectionner des substances naturelles ou mélanges de substances naturelles capables de potentialiser l'effet des rodenticides anticoagulants antivitamine K permettant d'envisager une amélioration de l'efficacité des rodenticides vis-à-vis des populations de rats résistants et une réduction des doses d'anticoagulants antivitamine K incorporés dans l'appât.

Une large revue bibliographique a permis de sélectionner les substances naturelles d'intérêt. Des tests *in vitro* préalables permettront d'améliorer les connaissances vis-à-vis de ces substances naturelles et de confirmer leur intérêt potentiel, en tant qu'agent potentialisateur de l'effet des rodenticides actuels. Néanmoins, seul l'expérimentation sur modèle animal permettra de démontrer l'efficacité de ces substances naturelles du point de vue pharmacodynamique mais aussi pharmacocinétique. Le modèle animal, en l'occurrence le rat, est l'objet d'étude et ne peut donc être remplacé.

Nous réduirons au maximum le nombre d'animaux en expérimentation. Un minimum de 4 animaux par groupe sera requis pour évaluer l'intérêt de la substance naturelle afin de disposer d'un test avec une puissance statistique satisfaisante. C'est donc le nombre d'animaux minimum nécessaire pour obtenir le résultat. Sur 5 ans, nous envisageons d'utiliser 2720 rats au maximum, pour nous permettre d'évaluer l'intérêt d'un maximum de 20 substances naturelles) potentialiser l'efficacité d'un maximum de 5 anticoagulants antivitamine K naturels ou synthétiques chez 4 lignées de rats différentes (une lignée de rat sensible et 3 lignées de rats résistants aux rodenticides anticoagulants porteurs de mutations sur le gène *Vkorc1* (correspondant aux mutations les plus fréquemment rencontrées en Europe chez le rat).

Nous raffinerons la méthodologie effectuée, ce qui implique la notion de points limites. Le processus de coagulation sera évalué systématiquement 48 heures après l'administration par gavage du rodenticide anticoagulant antivitamine K, ce qui est un temps suffisant pour entraîner une augmentation du temps de quick, mais est un délai trop court pour conduire à l'apparition de signes cliniques chez le rat. Néanmoins, tout signe de prostration ou d'hémorragies apparaissant au cours de ce laps de temps sera considéré comme un point limite et conduira à l'euthanasie des animaux. Les animaux seront conservés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être et leurs besoins sociaux. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et qualifié afin de limiter au maximum le stress et la souffrance causée par les tests.

16237 Un enjeu majeur pour les élevages de ruminants en France est de favoriser une transition vers des systèmes herbagers et peu dépendants d'intrants. Cette transition peut être facilitée par des réorientations des objectifs de sélection génétique. Dans la filière ovine, un des objectifs privilégiés pour cela est l'amélioration de l'efficacité alimentaire.

L'efficacité alimentaire représente la capacité des animaux à transformer l'aliment ingéré en lait ou en viande tout en limitant les rejets polluants. Chez les ovins, cette efficacité peut être améliorée grâce à la sélection mais cette possibilité a été établie à partir de mesures réalisées chez des agneaux en phase de croissance avec une alimentation riche. On ne sait pas si une telle sélection permettra d'obtenir des animaux qui sont aussi plus efficaces à un âge plus avancé et en ingérant des rations plus pauvres à base de fourrages ou au pâturage.

Chez les bovins, il a été montré qu'il existe un lien entre le niveau d'efficacité alimentaire et les capacités digestives des animaux. Notre projet porte sur l'exploration de la capacité digestive des jeunes ovins et la caractérisation de leur état d'engraissement en lien avec leur niveau génétique d'efficacité alimentaire.

Pour cette étude nous utiliserons des jeunes ovins issus de lignées sélectionnées de façon divergente pour l'efficacité alimentaire (une lignée hautement efficace RFI- et une lignée faiblement efficace RFI+).

Chaque année, à l'âge de 3 à 5 mois, des mâles des lignées RFI+ et RFI- sont testés pour leurs aptitudes bouchères (croissance, développement musculaire, engraissement) et leur efficacité alimentaire. Cette phase de contrôle dure 6 semaines durant lesquelles les animaux sont nourris ad libitum avec un aliment concentré à basse densité énergétique. Suite à cette première phase, les animaux sont testés pour leur ingestion de fourrage afin de savoir si les animaux de la lignée RFI- sont également plus efficaces que ceux de la lignée RFI+ dans le cadre d'un régime alimentaire plus fourrager. Notre projet porte sur la caractérisation des capacités digestives à l'issue de cette seconde phase, lorsque leur rumen sera bien développé suite à l'ingestion d'une ration riche en fibres. Sur les trois années, un total de 72 agneaux des lignées RFI- (haute efficacité alimentaire) et RFI+ (faible efficacité alimentaire) seront utilisés. Plus précisément, chaque année, 12 agneaux par lignée (soit un total de 24 agneaux par an) seront retenus (parmi les 80 agneaux testés pour l'efficacité alimentaire) pour des analyses par imagerie (CT-scan pour l'ensemble et IRM en plus pour la moitié d'entre eux). Sur les 3 années du projet, il y aura donc un total de 72 agneaux qui auront des mesures obtenues par imagerie. Ces 72 agneaux seront passés au scanner pour estimer i) leur état d'engraissement général, ii) le ratio taux de muscle/taux de gras, iii) le poids et le volume de certains organes (notamment le rumen, le foie et la rate), iv) ainsi que des tailles d'os. Parmi ces 72 animaux, 36 d'entre eux seront également étudiés par IRM afin d'analyser l'état d'engraissement interne par un focus sur les reins.

Ces images seront analysées de façon à identifier des différences en termes d'engraissement et d'anatomie entre les deux lignées sélectionnées RFI+ et RFI-.

Respect de la règle des 3 R :

- Raffiner : Les animaux étudiés dans ce projet sont élevés dans une unité expérimentale située à 200km du site d'imagerie. Afin d'éviter tout risque au moment de l'anesthésie lié au stress généré par le transport, les animaux arriveront la veille de l'acquisition d'images. Annuellement, les 24 animaux seront imagés par groupe de 6 sur 4 jours différents afin de permettre cette organisation. Sur place, il sera garanti qu'aucun animal ne se retrouvera isolé de ses congénères, en dehors de la phase d'acquisition d'images.

- Réduire : Le nombre d'animaux prévus dans le projet d'imagerie est limité : chaque année, nous caractériserons ainsi environ $\frac{1}{4}$ des animaux de chacune des deux lignées. Les animaux les plus extrêmes génétiquement seront analysés prioritairement afin de maximiser la probabilité d'observer des différences significatives.

- Remplacer : Aucun modèle alternatif ne peut être mis en place pour étudier les effets de la sélection génétique sur l'engraissement général et l'anatomie des agneaux. L'utilisation de l'imagerie est elle-même une alternative à l'abattage et la dissection des collatéraux des animaux sélectionnés.

16238 Les pays du bassin méditerranéen sont touchés depuis de nombreuses années par des épidémies de maladies vectorielles, telles que les leishmanioses (parasite *Leishmania* spp.), transmises par, notamment, les insectes phlébotomes. Ces pathologies sont également une menace pour l'Europe entière dont la France pour des raisons socio-environnementales : les changements climatiques, les voyages en zones endémiques ainsi que le transit de marchandises qui entraînent la colonisation de nouveaux habitats par les phlébotomes. Les manifestations cliniques de la leishmaniose chez les mammifères peuvent être cutanées et/ou viscérales. Cette dernière est mortelle si non traitée. La forme la plus courante de la maladie est la leishmaniose cutanée qui touche plus de 10 millions de personnes dans le monde avec au moins 1,5 million de nouveaux cas chaque année. En France, les réservoirs principaux du parasite sont les carnivores domestiques, les chiens et les chats. Chez l'Homme, 124 cas ont été répertoriés en 2018 au centre national de référence des leishmanioses. Jusqu'à présent, le traitement de la maladie repose sur une chimiothérapie insatisfaisante et toxique, limitée suite à l'émergence de parasites résistants. Le seul moyen de défense est préventif, par l'utilisation de répulsifs contre les phlébotomes ou la vaccination chez les chiens, qui est d'efficacité limitée. La mise au point d'un vaccin contre les leishmanioses est donc une urgence et une priorité stratégique dans le contrôle de cette maladie avec des applications en santé humaine et vétérinaire. L'émergence de nouvelles souches résistantes de *Leishmania* sp donne lieu à des spectres cliniques très diversifiés chez les espèces animales infectées. Pour lutter plus efficacement contre ces parasites, les mécanismes de défense de l'hôte et de virulence du parasite doivent être étudiés de manière approfondie. À cette fin,

des modèles animaux rongeurs sont largement utilisés. Des résultats préliminaires utilisant un vaccin contenant des nanoparticules (NP) chargées d'antigènes totaux (AT), ont démontré une immunisation protectrice contre divers agents infectieux et l'absence d'immunotoxicité dans différents modèles animaux (souris, brebis et singes). De plus, ces vaccins candidats sont sûrs, plus stables et plus efficaces, sans adjuvant ni aiguille. Ainsi, des voies d'application moins invasives pour les animaux seront évaluées. Ce projet vise, donc, à développer un nouveau vaccin multivalent constitués de NP et AT de *Leishmania*, qui agit à titre prophylactique et thérapeutique sur des modèles rongeurs de leishmanioses humaines et canines, sensibles et résistantes à la chimiothérapie conventionnelle. Pour ce faire, des souris BALB/c et des hamsters dorés seront immunisés deux fois, par voie nasale ou sous-cutanée, avec les vaccins sélectionnés, dans des intervalles de 15 jours entre chaque immunisation. L'efficacité prophylactique de la vaccination contre l'infection sera évaluée en fonction de l'infection post-vaccinale, tandis que les évaluations immuno-thérapeutiques consisteront en une infection antérieure et des immunisations ultérieures. Dans ce but, il est nécessaire de démontrer la réduction significative de la charge parasitaire chez des animaux infectés (avant et après l'immunisation) ainsi que la stimulation spécifique du système immunitaire en comparaison avec des groupes témoins infectés et vaccinés avec des formulations commercialisées pour les chiens, ou traités avec des médicaments de référence. Il est donc important de considérer différentes souches de *Leishmania*, cutanées et viscérales, sensibles et résistantes, ainsi que caractériser l'infection de chaque souche choisie dans le modèle murin le plus proche de la reproduction d'une infection humaine ou canine. Seul, le modèle *in vivo* permettra de vérifier la validité du concept. Le modèle *in vivo* est ainsi incontournable car les modèles *in vitro* ne tiennent pas compte de la complexité du système immunitaire et des barrières physiologiques d'un mammifère. La souris BALB/c et le hamster doré répondent différemment à l'infection, en reproduisant des états physiopathologiques, cliniques et immunologiques similaires à ceux produits par la leishmaniose canine et humaine, ce qui en fait des modèles de choix, reconnus par la communauté scientifique internationale comme étant indispensables et complémentaires pour l'évaluation préclinique d'un vaccin contre la leishmaniose. Une planification statistique préalable a permis de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'évaluation d'activité des vaccins. Deux expérimentations par an et par espèce sont estimées où deux paramètres seront étudiés, la réponse immunitaire et la protection. Ainsi, 1532 animaux (796 hamsters dorés et 736 souris BALB/c) seront utilisés sur 5 ans. Les expériences sont conçues dans le respect des règles des 3R, et les signes de souffrance/douleur (préétablis par l'observation expérimentale de l'évolution de la maladie chez chaque espèce et de l'application de chaque procédure) notés selon un score. Dans le cadre du bien-être des animaux, les interventions considérées comme invasives, telles que les injections, seront précédées d'une anesthésie locale.

Il est connu que le développement de la leishmaniose est indolore chez l'homme. Cependant, dans la forme symptomatique de la maladie, il peut y avoir une hépatosplénomégalie chez l'hôte générant des signes de douleur lors de la manipulation abdominale, une cachexie et une dégradation de l'aspect physique, à savoir la perte de poils et l'évolution des lésions cutanées. Ainsi, l'état général des souris lié ou non au développement de la leishmaniose sera contrôlé quotidiennement et noté selon un score et des actions adaptées seront mises en place si nécessaire.

Alternatives de remplacement, réduction et raffinement principaux: 1) application de tests *in vitro* sur des cellules immunitaires en culture pour sélectionner les antigènes vaccinaux les plus efficaces pour générer une réponse immunitaire requise et ainsi diminuer les formulations à tester *in vivo*; 2) harmonisation des essais et des données d'expériences précédents, ainsi que combinaison des expériences de prophylaxie et d'immunothérapie *in vivo* pour utiliser le mêmes groupe de contrôles; 3) utilisation de techniques sérologiques dans lesquelles la présence d'anticorps spécifiques dans le sang d'animaux immunisés est utilisée comme méthode de surveillance d'induction de séroconversion après la vaccination; 4) utilisation des méthodes les moins douloureuses de prélèvement sanguin, la veine sous-mandibulaire et la veine saphène ; 5) utilisation d'analgésiques s'il y a un signe de douleurs abdominales, qui peuvent être liées à l'hépatosplénomégalie générée par la leishmaniose.

16239 La sténose valvulaire aortique calcifiée est une maladie très fréquente (plus 10 000 remplacements valvulaires aortiques en France en 2016). Elle touche essentiellement la population âgée, et l'une des

solutions les plus fréquemment proposée est le remplacement de la valve aortique par une prothèse valvulaire artificielle. Celle-ci peut être mécanique en carbone pyrolytique mais un traitement anticoagulant à vie est alors nécessaire pour éviter tout risque d'embolie. Il existe des bioprothèses constituées de péricarde bovin ou porcine : ces biomatériaux sont couramment utilisés, ainsi le péricarde (membrane très fine qui entoure le cœur), est utilisé comme matrice pour la fabrication de valves ou de prothèses en chirurgie cardio-vasculaire depuis plus de 30 ans. La pose de ces bioprothèses ne nécessite pas de traitement anticoagulant. Elles ont tendance néanmoins à se calcifier avec le temps, c'est pourquoi il est nécessaire de comprendre leur devenir après implantation. L'étude de l'évolution (notamment la calcification), du péricarde bovin, au long terme, ne peut se faire que sur l'animal vivant, en raison de la complexité des interactions entre les cellules, le milieu environnant et l'implant. Il s'agit d'un complément indispensable aux études effectuées *in vitro* par des techniques de culture cellulaire. L'objectif principal de ce projet est d'évaluer le devenir du péricarde bovin en termes de calcification, dégradation et recolonisation par les cellules du tissu environnant.

AMENDEMENT : Nous implanterons des disques de péricarde bovin en sous cutané sur le dos de rats pour une durée de 5 à 45 jours (au lieu de 30 jours). Cette étude portera sur 600 rats au total (au lieu de 160), 300 rats immunocompétents (Wistar) et 300 rats immunodéprimés (Nude) qui permettront de s'affranchir de la réaction immunitaire et d'étudier la recolonisation du péricarde par prétraitement de celui-ci par des cellules progénitrices endothéliales (PEC) humaines ou des Cellules Interstitielles de Valves (VIC). Les rats seront implantés à l'âge de 12 jours, ce qui est le modèle le plus utilisé de calcification permettant une réaction biologique rapide. Les premiers résultats ayant permis une avancée importante dans la compréhension des mécanismes de la calcification du péricarde bovin, une augmentation du nombre d'animaux permettront de les confirmer et de les approfondir en vue de leur publication.

Pour respecter la règle des 3R, et donc réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous limiterons le plus possible le nombre de rats utilisés en implantant 4 disques par rat. L'ensemble des procédures d'implantation sera effectué sous anesthésie générale afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux. Des antalgiques sont prévus en post-opératoire. Les rats seront régulièrement surveillés avec un score de suivi permettant de détecter une éventuelle souffrance animale. Des points limites ont été établis qui entraînent la mise à mort anticipée de l'animal si besoin. L'explantation se fera en post mortem afin de ne pas causer de risque de souffrance. Ce travail permettra de mieux comprendre le devenir des bioprothèses en péricardes implantées sur le long terme. Il apportera des informations importantes sur la recolonisation de ces tissus par les cellules de l'hôte et les moyens d'optimiser leur utilisation pour remplacer des valves cardiaques déficientes.

16240 Chaque année, les pertes céréalères totales liées à la consommation directe par les rongeurs ou à la dégradation due à leur excréta, seraient de l'ordre de 10% de la production mondiale. Les rongeurs constituent un réservoir de plus de 40 zoonoses, tuant des milliers de personnes chaque année à travers le monde. Le contrôle de leur prolifération semble donc constituer un enjeu majeur de santé publique.

En Europe, ce contrôle est aujourd'hui assuré par des appâts contenant des molécules raticides. Ces appâts peuvent être des céréales (avoine, blé, ...), des pâtes, des blocs, des mousses. Ces appâts doivent obligatoirement être homologués par les autorités compétentes pour pouvoir être commercialisés. Le contenu des dossiers d'homologation est établi par les autorités européennes. Ces derniers doivent contenir des données d'appétence et d'efficacité en laboratoire et en conditions terrain ou en conditions semi-field, sur les espèces contre lesquels sont revendiqués ces appâts.

Ce protocole a pour but d'évaluer l'efficacité d'appâts, en conditions semi-fields chez le rat, en vue de leur homologation par les agences européennes selon les lignes directrices européennes « Guidance on the Biocidal Products Regulation. Volume II Efficacy - Assessment and Evaluation (Parts B+C), Version 3.0, April 2018 », sur les espèces contre lesquels l'appât sera revendiqué, c'est-à-dire les rats bruns et les rats noirs), le comportement alimentaire de ces espèces étant différent.

L'utilisation des animaux ne peut donc être évitée. Au moins 90% d'efficacité et 20% d'appétence doivent être obtenues pour que l'appât puisse être homologué. Un minimum de 10 animaux par groupe

sera requis pour évaluer un appât tout en ayant une puissance statistique suffisante. Ce minimum de 10 est de plus imposé par les lignes directrices. Sur une période de 5 ans, nous envisageons de réaliser 5 essais avec 10 rats noirs et 5 essais avec 10 rats bruns par an, soit un total de 250 rats noirs et de 250 rats bruns sur la période de 5 ans pour générer les données nécessaires à la constitution des dossiers d'homologation.

Nous raffinerons la méthodologie effectuée, ce qui implique la notion de points limites.

Toute observation de signe de prostration, d'hémorragies et autres signes cliniques définis par l'OCDE sera considérée comme point limite et conduira à l'euthanasie des animaux qu'il sera possible d'attraper, avec des pinces, sans que cela ne génère de stress au reste de la population dans le système d'essai. Les animaux seront conservés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être et leurs besoins sociaux. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et qualifié afin de limiter au maximum le stress et la souffrance causé par les tests.

16241 Cette expérimentation s'insère dans un projet dédié à l'étude du micro-environnement tumoral par imagerie par résonance magnétique (IRM) en développant des séquences où chacune d'une façon spécifique exploite un paramètre physique qui renseigne sur une fonction biologique en relation avec la physiopathologie du tissu cancéreux.

Nos expériences consistent

1- A cartographier le paramètre physique IRM et définir sa sensibilité en fonction de l'hétérogénéité tumorale et de définir ses variations au cours de la croissance tumorale

2- D'étudier les variations de ce paramètre et sa sensibilité suite à une injection d'une drogue thérapeutique, diagnostique ou fonctionnelle, expérimentale ou déjà approuvée en clinique.

Dans ce projet, nous utiliserons une méthode IRM qui permet de cartographier le pH extracellulaire (pHe) de tumeurs de seins, de poumons ou bien d'origine pancréatique, implantée en sous-cutané chez la souris.

Pour cela, une IRM sera réalisée après injection en intraveineux d'un agent de contraste clinique (approuvé en clinique) : l'lopamidol

Nous disposons ainsi d'un outil puissant qui permettra *in vivo* de montrer comment cibler des thérapies anti-cancéreuses et de réaliser des suivis pour évaluer leurs efficacités.

Au total sur les deux 2 ans du projet, le nombre maximal de souris utilisées sera de 60 souris.

Réduction: Ce nombre d'animaux a été déterminé afin d'obtenir des résultats standardisés et reproductibles en réduisant un 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 à l'aide d'une technique non invasive qu'est l'IRM. 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: L'étude *in vivo* sur des modèles animaux comme la souris est inévitable si on veut étudier le microenvironnement tumoral et comprendre les différents processus de la pathophysiologie de la tumeur qui sont spatio-temporels. L'IRM qui est une technique non invasive et riche qui permet d'apporter des informations multiples et *in vivo*. L'expérimentation animale est une étape nécessaire pour un transfert de la méthodologie en clinique.

Le protocole de recherche que nous proposons est un protocole quantitatif, il devrait apporter des informations uniques, utiles pour tester l'efficacité de nouvelles thérapies ou encore ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

La souris immunodéprimée est le modèle le plus pertinent pour étudier la tumorigénèse de cellules humaines cancéreuses par xénogreffe.

16242 Le lithium, traitement régulateur de l'humeur est prescrit chez les patients souffrant de troubles bipolaires. Sa grande efficacité en fait le traitement de référence pour cette maladie. Cependant, une

toxicité rénale est décrite chez les patients traités. Elle se caractérise par le développement de diverses pathologies telles que le diabète insipide néphrogénique, l'apparition de kystes rénaux ou encore une insuffisance rénale à plus long terme. Bien que décrits et reconnus, les mécanismes de cette toxicité au lithium ne sont encore que très peu identifiés.

Les objectifs de ce projet seront donc premièrement de mettre au point, chez le rat Sprague-Dawley, un modèle de traitement pharmacologique similaire à celui utilisé chez l'Homme, afin de mimer les symptômes retrouvés ainsi que leur cinétique d'apparition au cours du traitement et de pouvoir les étudier au niveau tissulaire et moléculaire aux doses prescrites chez les patients. Nous analyserons les conséquences de l'exposition au lithium au long cours par l'étude de marqueurs permettant d'évaluer ses effets sur le comportement, la fonction rénale globale ainsi que les différentes zones du rein (tubules, médulla) pouvant être ciblées par cette toxicité. Les différents mécanismes de transport du lithium, ainsi que ses principales cibles cellulaires et leur contribution à la toxicité rénale seront caractérisés. Enfin, l'évaluation de l'efficacité de différents traitements préventifs de cette toxicité sera réalisée afin de proposer une stratégie thérapeutique adéquate pour les patients sous lithium.

Afin que ce projet respecte au mieux l'éthique animale, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux nécessaires en évitant de répéter les études déjà rapportées dans la littérature, en déterminant un nombre minimal statistique de rats à utiliser pour éviter de réaliser des expériences sans valeur statistique. Nous atténuerons voire supprimerons la douleur, la souffrance, et/ou l'angoisse des animaux en ayant notamment recours à une anesthésie générale profonde avant tout geste invasif, en respectant un délai d'une à deux semaines entre deux procédures stressantes (prélèvement sanguin ou urinaire, injection), et en ayant recours à des points limites adaptés et bien décrits, nous permettant une prise en charge rapide d'un éventuel mal-être par une analgésie ou une mise à mort en cas de souffrance trop importante.

Bien que la nécessité de travailler sur un organisme corps entier soit indispensable à la compréhension des mécanismes de toxicité du lithium en raison des interactions entre différents systèmes ou organes, des études *in vitro* seront réalisées sur des cultures cellulaires de reins afin de tester certaines des hypothèses de recherche et définir les doses optimales de traitement à utiliser.

En définitive, 80 rats Sprague-Dawley mâles seront nécessaires à la réalisation de ce projet afin de mieux comprendre les effets secondaires observés chez l'Homme, mais surtout de les prévenir ou d'en permettre une meilleure prise en charge. La durée totale de ce projet est de 5 années.

16243 Chaque année, les pertes céréalieres totales liées à la consommation directe par les rongeurs ou à la dégradation due à leur excréta, seraient de l'ordre de 10% de la production mondiale. Les rongeurs constituent un réservoir de plus de 40 zoonoses, tuant des milliers de personnes chaque année à travers le monde. Le contrôle de leur prolifération semble donc constituer un enjeu majeur de santé publique.

En Europe, ce contrôle est aujourd'hui assuré par des appâts contenant des molécules raticides. Ces appâts peuvent être des céréales (avoine, blé...), des pâtes, des blocs, des mousses. Les rongeurs étant des animaux néophobes, ces appâts doivent être appétents d'autant qu'ils sont très souvent utilisés sur le terrain dans des endroits où la concurrence alimentaire est forte. Une fois la formulation optimisée, ces appâts doivent être homologués par les autorités compétentes avant commercialisation. Le contenu des dossiers d'homologation est établi par les autorités européennes. Ce dernier doit contenir impérativement des données d'efficacité en laboratoire sur les espèces contre lesquels sont revendiqués ces appâts.

Ce protocole a pour 1/ d'améliorer les formulations des appâts afin d'augmenter leur appétence pour les rongeurs et/ou, 2/ de générer les données d'efficacité requises par les autorités européennes pour accorder les homologations, une fois la formulation définitive. Ces données sont générées en partenariat avec différents industriels fabriquant des rodenticides.

L'optimisation des formulations visant à améliorer l'appétence des appâts peut être réalisée sans ou avec matière active et nécessite de réaliser des essais d'appétence par suivi de la consommation sur les rongeurs destinataires de ces appâts (rats bruns, rats noirs et souris), le comportement alimentaire de ces 3 espèces étant différent. Pour qu'une formulation soit homologable, elle doit à minima être plus

appétente et donc plus consommée qu'un aliment standard (grain de blé...). Si la consommation est insuffisante, la formulation ne sera pas homologuée et les données d'efficacité ne seront pas nécessaires. Les données d'efficacité nécessaires au dossier d'homologation doivent être générées selon la ligne directrice européenne « Guidance on efficacy assessment for product type 14 rodenticides » sur les espèces pour lesquels l'appât est revendiqué. Au moins 90% d'efficacité doit être obtenu pour que l'appât soit homologué.

Qu'ils s'agissent d'essai d'appétence ou d'efficacité, un minimum de 10 animaux par groupe permet d'avoir une puissance statistique suffisante et ce nombre est requis par la ligne directrice. Sur une période de 5 ans, nous envisageons d'utiliser 8150 rongeurs pour améliorer la formulation de 25 appâts (5 formulations par an) et générer les données d'efficacité de 16 dossiers d'homologation par an (4 molécules actives et 4 supports) en conditions de laboratoire. Ce nombre d'animaux pourrait être plus faibles car il est sujet à la demande industrielle.

Nous raffinerons la méthodologie effectuée, ce qui implique la notion de points limites.

Toute observation de signes de prostration avancée, d'hémorragies importantes, de pâleur extrême des muqueuses, de perte de poids importante, de déshydratation, de signes convulsifs et autres signes cliniques que nous pourrions définir au cours des études sera considérée comme point limite et conduira à l'euthanasie des animaux. Au cours des essais, les animaux seront conservés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être et leurs besoins sociaux. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et qualifié afin de limiter au maximum le stress et la souffrance causé par les tests

16244 Entre les repas, l'organisme est capable de maintenir le taux de glucose (sucre) dans le sang (glycémie) à environ 1g/L, grâce à une production rapide de glucose par le foie. En effet, l'organisme va dégrader ses stocks de sucre, le glycogène, qui s'est accumulé dans le foie pendant le repas. Cette fonction est affectée dans le cadre d'une maladie génétique rare: la glycogénose de type 3 qui est due à une absence de dégradation complète du glycogène. Ainsi, la production de glucose sera fortement réduite chez les patients atteints de glycogénose de type 3 qui auront du mal à maintenir une glycémie normale (glycémie trop basse) entre deux repas.

En plus des hypoglycémies, les patients atteints de glycogénose de type 3 présentent des complications hépatiques importantes pouvant mener au développement d'une cirrhose (fibrose importante du foie) et de tumeurs du foie. Ce projet devrait permettre de mieux définir les mécanismes moléculaires du développement tumoral afin d'adapter le traitement des patients.

Cette étude consistera à caractériser le développement de tumeurs du foie dans un modèle de souris transgéniques atteintes de glycogénose de type 3. Ces souris reproduisent toute la pathologie humaine et développent spontanément (dans 30% des cas) des tumeurs hépatiques à l'âge de 14-15 mois, sans perte de la fonction hépatique. Dans cette étude, les souris seront nourries avec un régime connu pour induire un foie gras (régime riche en gras et en sucres rapides) ou un régime favorisant le développement d'une fibrose (régime déficient en acides aminés) afin de favoriser et accélérer le développement de tumeurs. L'évolution de la taille des tumeurs sera suivie par imagerie scanner hebdomadaire. Les voies moléculaires impliquées dans le développement tumoral seront analysées par des études histologiques et moléculaires 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 requière un dialogue complexe, entre divers types de cellules hépatiques, mais aussi avec d'autres organes.

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 d'un maximum 120 souris (mâles ou femelles) transgéniques et contrôles.

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. La mise en place d'études « pilote » permettra d'évaluer les risques de développement tumoral précoce grâce à un suivi du développement de tumeurs réalisé par imagerie scanner. Associé aux tests biologiques reflétant un dysfonctionnement du foie et au comportement des animaux, ce suivi des animaux permettra de maintenir le bien-être animal.

Ce projet devrait permettre de déterminer les voies moléculaires impliquées dans le développement de tumeurs hépatiques chez des souris atteintes de glycogénose de type 3. L'étude pilote permettra aussi de mettre au point les conditions d'imagerie au scanner nécessaires pour le suivi du nombre et de la taille des tumeurs.

16245 La cryptosporidiose est une maladie zoonotique due au parasite protozoaire *Cryptosporidium parvum*. La contamination par ce parasite se fait par voie orale après ingestion d'aliments ou d'eau contaminée par le parasite. Ce parasite protozoaire se développe dans l'intestin de son hôte et provoque des diarrhées dont l'importance dépend du statut immunitaire de l'hôte. Ainsi, les jeunes ou les sujets immunodéficients sont très sensibles à cette maladie. Chez l'homme, cette maladie est très répandue dans les pays en voie de développement et dans les pays industrialisés, il arrive que ce parasite soit à l'origine d'épidémies notamment l'été lorsqu'il contamine les eaux des piscines. En santé vétérinaire, ce parasite est un réel problème pour les éleveurs de jeunes ruminants puisqu'il est le premier agent responsable des diarrhées néonatales des veaux. Les infections des jeunes veaux ont un impact sur le coût de production mais également pour la contamination de l'environnement puisque les ruminants sont le réservoir principal de ce parasite. Le modèle souris est très utilisé pour les études fondamentales en immunologie mais également pour les essais de traitement. Les souriceaux développent l'infection et élimine naturellement le parasite en 3 semaines comme le font les jeunes ruminants. La souris adulte est relativement résistante à l'infection sauf si elle est déficiente pour des composants de la réponse immunitaire.

Cette demande concerne l'utilisation du modèle expérimental murin de la cryptosporidiose (souriceaux nouveau-nés ou souris adultes, conventionnels ou génétiquement modifiés) pour des études en immunologie. Les expériences sur les souriceaux sont les plus fréquentes (1 à 2 par mois selon l'expérience) alors que les études sur adultes sont plus ponctuelles. Cette demande sur 5 ans représente environ 4320 souriceaux (soit 864 par an), 720 mères gestantes (soit 144 par an), 540 souris adultes (soit 108 par an).

Nombre animaux sur 5 ans : 5580

Une expérience type est réalisée avec les souriceaux :

Elle consiste à comparer la sensibilité à l'infection par *C. parvum* de souriceaux conventionnels à des souriceaux génétiquement modifiés (Tg) ou des souriceaux de fond génétique différents (Balb/c, C57BL/6, CBA/J...) (procédure 1). Ainsi une expérience est constituée au minimum de 2 lots : un lot de souriceaux conventionnels infectés (en moyenne 18 soit environ 3 mères) et un lot de souriceaux infectés de type Tg ou d'un autre fond génétique. Pour étudier la sensibilité à l'infection au cours du temps, nous travaillons généralement à 3 points post-inoculation au début d'infection, au pic et pendant la phase de récupération (6 souriceaux à chaque point d'analyse prélevés des différentes cages (pour éviter le biais « effet mère »)).

Une expérience avec des souris adultes est constituée également d'un minimum de 2 lots : un lot de souris infectées génétiquement modifiées (18 souris sacrifiées à 3 temps différents) et un lot de souris conventionnelles (18 souris sacrifiées à 3 temps différents), ce qui fait une moyenne maximale de 36 souris adultes par expérience type.

Ce projet s'inscrit dans la dynamique de respect de la règle des 3 R en expérimentation animale :

Réduire : Le plan expérimental (nombre d'animaux par lot, nombre de lots expérimentaux, répétition des expérimentations) a été établi de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en s'assurant de l'exploitabilité et de la significativité des résultats. Pour le paramètre de comptage de parasites, avec 6 animaux par groupe et une différence entre les 2 lots d'au moins 40%, la puissance statistique calculée à partir de données issues d'essais préliminaires est de 81% avec un seuil alpha de 0.05 pour un test de Mann-Whitney. Toutefois, malgré l'enrichissement, l'état de stress qui caractérise certaines lignées de souris favorise le cannibalisme, c'est pourquoi plus d'animaux sont mis en reproduction. Les animaux surnuméraires sont toujours utilisés et peuvent être introduits dans un autre protocole.

Raffiner : Raffinement : Les souris sont hébergées en animalerie A2 en atmosphère contrôlée, à raison de 5 souris maximum lorsqu'elles sont adultes ou 1 mère avec sa portée par cage dans un environnement enrichi (papier absorbant qui diminue le cannibalisme des souris à la mise-bas). Toute médication est proscrite pour ne pas interférer avec les paramètres immunologiques étudiés. Cependant les animaux sont suivis plusieurs fois par jour (enrichissement social) afin de prendre une décision rapide en cas d'atteinte des points limites durant tout le protocole et de limiter la douleur induite : (i) de souriceaux mis à l'écart par la mère, qui ne grossissent pas ou dont le pelage ne se développe pas (lié au retard de croissance), (ii) de souris amaigries, prostrées et avec le poil ébouriffé. Nous prenons encore plus de précautions (bruit) lors des visites lorsqu'il s'agit d'expérimentations avec les femelles gestantes et les premiers jours suivant la mise-bas.

Remplacer : l'étude de l'immunologie mucosale dans un contexte infectieux ne peut être réalisée sans expérimentation animale. En effet, les études *in vitro* ne tiennent pas compte de la complexité des coopérations cellulaires et de la présence du microbiote intestinal.

16246 L'ostéoporose est une maladie qui fragilise les os, fréquente chez les femmes après la ménopause, mais qui peut également survenir chez des patients plus jeunes ou chez l'homme. L'ostéoporose se traduit par une densité minérale de l'os faible, avec un risque accru de fracture. Elle résulte d'un déséquilibre entre la formation et la destruction (ou résorption) de l'os. Du fait d'un mécanisme de couplage entre la formation et la résorption osseuse, qui conduit au remodelage de l'os, la majorité des traitements de l'ostéoporose qui bloquent la résorption bloquent également la formation osseuse. Il existe un réel besoin de traitements anti-ostéoporotiques qui stimulent la formation osseuse. Dans cette optique, il semble naturel de s'intéresser à la voie Wnt, un acteur clé de la formation osseuse. Il s'agit d'une voie de signalisation cellulaire, qui permet la transmission d'un message à l'intérieur de la cellule pour moduler l'action de la cellule. Lorsque la protéine Wnt se fixe à ses récepteurs à la surface cellulaire (appelés LRP5 et Frizzled notamment), cela aboutit à l'activation de gènes impliqués dans la formation osseuse. L'absence ou le blocage de cette voie de signalisation induit donc une diminution de la formation osseuse. Cependant, de nombreux points restent à éclaircir concernant la régulation osseuse par la voie Wnt.

Chez l'Homme, des mutations de LRP5 ont été identifiées, notamment une mutation appelée p. Val667Met, que l'on trouve dans un syndrome appelé Ostéoporose pseudogliome (OPPG). Cette maladie est caractérisée notamment par une ostéoporose sévère et une atteinte oculaire, mais qui a aussi été décelée chez des hommes jeunes atteints d'ostéoporose sans cause retrouvée. Nous avons constitué une cohorte de patients jeunes ostéoporotiques et avons pu constater que l'on trouve cette mutation à une fréquence plus élevée chez ces patients que dans la population générale. D'autres mutations de LRP5 ont également été détectées chez ces patients. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la mutation p. Val667Met pourrait expliquer en grande partie l'ostéoporose chez ces patients jeunes, et pourrait avoir une influence sur la façon dont ils vont répondre aux traitements anti-ostéoporotiques.

L'objectif principal de cette étude est de caractériser l'effet de cette mutation sur l'os. Comme la mutation touche un récepteur impliqué dans la voie Wnt, nous chercherons à déterminer comment fonctionne la voie Wnt en présence de cette mutation et quel effet on obtient sur la formation et la résorption de l'os, ainsi que sur le développement de la rétine.

Nous chercherons les réponses à ces questions grâce à des expériences de culture cellulaire, mais également grâce à un modèle de souris qui porte la mutation décrite chez l'homme. En effet, les

expériences *in vitro* ne permettent pas de mimer de façon satisfaisante le remodelage osseux en raison de multiples interactions cellulaires et tissulaires, et de l'influence de la composante mécanique, hormonale et du vieillissement intervenant dans l'ostéoporose. L'expérimentation animale a été conçue afin de respecter la règle des 3R. Le nombre de souris sera réduit au minimum nécessaire (au maximum, 288 souris seront nécessaires). Ce nombre a été calculé afin de pouvoir observer des différences significatives lors des procédures, selon les données de la littérature et l'effet des procédures attendues. Un maximum d'information sera récupéré par animal (prélèvements de différents os, de sang, d'urines, des yeux) afin de pouvoir répondre aux différentes questions qui se poseront lors de l'étude tout en limitant le nombre d'animaux. De même, plusieurs procédures seront réalisées sur les mêmes animaux (mesure de densité minérale osseuse et phénotypage avec mise à mort). Les animaux seront maintenus par groupe de 6 par cage, nourris ad libitum, dans un environnement enrichi (matériel pour nidification). Ils seront suivis de façon rapprochée suite aux procédures, tout comportement associé à un malaise de la souris (prostration, modification du comportement, poils hérissés et ternes, hypoactivité, prostration, vocalisations, boitement) ainsi que des signes locaux d'inflammation (œdème, induration) seront recherchés et consignés. Si nécessaire, des injections d'antalgique par voie sous-cutanée (Buprénorphine à la dose de 50 µg /kg) ainsi que l'installation de nourriture plus accessible seront mises en place. Si ces signes persistent et que l'animal perd 20% de son poids malgré les traitements antalgiques dans les 72h, il sera alors retiré de l'expérimentation et mis à mort afin d'éviter la souffrance.

Ce projet permettra de mieux comprendre comment la mutation p. Val667Met influe sur la résistance osseuse mais également d'obtenir des enseignements sur le fonctionnement de la voie Wnt, qui a un rôle majeur dans la formation osseuse.

16247 La réduction de l'utilisation des intrants médicamenteux est aujourd'hui une priorité en élevage. Les volailles sont pleinement concernées par cet objectif. L'accent doit être mis sur la prévention des problèmes de santé plutôt que sur leur traitement. L'enjeu est de développer des systèmes d'élevage qui permettent aux animaux d'être plus robustes.

En filière poulets de chair, les poussins éclosent au couvoir avant d'être transportés dans le bâtiment. Les conditions de transport génèrent un stress important chez ces jeunes animaux qui peut avoir des conséquences importantes sur leurs performances et/ou leur santé. Limiter le stress du jeune poussin est donc un enjeu important pour une meilleure gestion de sa santé et une meilleure productivité. Par ailleurs, des études ont montré que le microbiote digestif des animaux influence leur développement, et plus particulièrement celui de leur système immunitaire. L'implantation initiale du microbiote se fait à partir des microorganismes présents dans l'environnement à la naissance. Dans les systèmes d'élevage actuel, les salles d'élevage sont généralement désinfectées avant l'arrivée des poussins et ceux-ci ne sont plus en contact avec leurs génitrices ce qui limite leur contact avec un microbiote diversifié et mature. Dans ce contexte, le développement d'un système d'élevage avec éclosion en bâtiment et présence d'un microbiote diversifié et mature (i.e. de poule adulte en bonne santé et exempte de pathogènes) pourrait limiter le stress postnatal et favoriser le développement optimal des fonctions digestive et immunitaire. Toutefois, les modalités pratiques et les conséquences physiologiques de ces pratiques innovantes restent à déterminer.

Le projet consistera donc à évaluer l'intérêt de l'éclosion en bâtiment et de la présence de poules adultes avec des poussins d'1 jour dans le but de mettre en place les conditions sanitaires et de bien-être pour optimiser le démarrage des poussins et leur santé au cours de leur vie.

Remplacement : Compte-tenu de l'objectif appliqué du projet en santé animale et zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro*. L'objet de l'étude est l'animal dans son milieu d'élevage. Le recours aux animaux vivants reste donc nécessaire, afin d'étudier les réponses physiologiques et comportementales des individus face aux stimuli auxquels ils sont exposés.

Réduction : Le nombre total d'animaux élevés (600 animaux) est suffisant pour avoir des conditions d'élevage représentatives et est nécessaire pour évaluer les effets zootechniques et sur la santé des poulets. Pour les 5 conditions expérimentales testées, un nombre de 60 animaux prélevés est

nécessaire et suffisant pour échantillonner suffisamment de sang et établir des conclusions significatives.

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux se rapprochent de celles d'un élevage avicole standard (en groupe, au sol sur des copeaux). 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 sont 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.

16248 Le cancer du sein est le plus courant chez la femme à travers le monde et le cancer du sein métastatique, malgré l'amélioration des traitements existants, continue à être responsable de nombreux décès. Il est donc essentiel de concevoir de nouvelles stratégies capables de cibler ce type de cancer. Il a été récemment montré que l'environnement tumoral est non seulement formé de cellules cancéreuses mais également de cellules immunitaires. Si les cellules immunitaires reconnaissent en principe les cellules cancéreuses et les éliminent, elles sont malheureusement parfois incapables de le faire dans l'environnement tumoral. Ceci est dû à l'action immunosuppressive de l'environnement tumoral sur les cellules immunitaires. Les cellules de type macrophages peuvent contribuer à l'établissement de cet environnement immunosuppresseur. C'est pour cette raison que nous nous intéressons au rôle d'une protéine, la protéine SHP, impliquée dans la biologie des macrophages. En effet, nos données suggèrent que SHP limite l'induction d'un environnement immunosuppresseur dans l'environnement tumoral. Nous allons donc tester si l'activation de SHP est capable de limiter la progression tumorale. Pour cela nous travaillerons avec deux modèles tumoraux. Un premier modèle tumoral EO771 qui est une lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire murin dérivée de souris C57BL/6 et un deuxième modèle de cancer du sein spontané. Cette stratégie a pour but d'obtenir des résultats potentiellement transposables aux cancers du sein chez l'homme. Nous réaliserons un suivi de la croissance tumorale des animaux qui auront été traités ou non avec un produit activant la fonction de SHP. Nous testerons également l'effet de notre produit sur les cellules immunitaires *in vitro*. Le nombre total de souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet est 168.

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 deux fois et réalisées avec un nombre réduit d'animaux par groupe ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. L'étude de l'effet immunomodulateur de SHP sur des cellules immunitaires *in vitro* permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (injection sous-cutanée) est réalisée sous anesthésie afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude.

16249 La grippe saisonnière est une infection virale aiguë. Il existe 3 types : A, B et C. Chaque année, la grippe est responsable d'environ 5 millions de cas de maladies graves, et 290 000 à 650 000 décès dans le monde.

Le meilleur moyen de se prémunir de la maladie est la vaccination. Les vaccins grippaux actuels sont conçus pour protéger contre 3 ou 4 souches : deux souches A et une ou deux souches B. Malgré l'existence de vaccins, certains besoins ne sont pas satisfaits, comme :

1) la protection des populations âgées, mauvais répondeurs aux vaccins actuels, avec l'intérêt de cibler des antigènes grippaux moins variables et de stimuler la réponse des lymphocytes T.

2) la nécessité d'une protection croisée contre plusieurs virus de la grippe en raison des variations saisonnières ou de l'émergence de nouveau virus pandémique.

3) En cas de pandémie, il faut pouvoir développer et produire rapidement des vaccins induisant une réponse immune efficace. L'adjonction d'adjuvant est avérée augmenter l'immunogénicité des vaccins, permettant de réduire la quantité d'antigène (recommandation de l'OMS) et d'élargir la protection.

Ce projet de recherche permettra donc réaliser l'ensemble du développement préclinique et d'évaluer l'efficacité d'un nouveau candidat-vaccin, pour comprendre les réponses immunitaires induites, afin de pallier les problèmes des vaccins saisonniers de la grippe et de mieux traiter les patients avec un

nouveau vaccin capable d'induire une activation lymphocytaire avec une meilleure protection contre à la fois la souche A et B de la grippe.

Il est nécessaire alors :

- 1) d'étudier l'activation du système immunitaire chez la souris avec les 2 protéines qui composent le candidat-vaccin universel
- 2) compléter l'évaluation pharmacologique des 2 protéines (souches A + B) chez la souris, pour évaluer l'immunogénicité et leur capacité à induire une protection contre différentes souches des virus de la grippe.
- 3) démontrer l'utilité d'un adjuvant pour un vaccin pandémique (protéine souche A+B+Adjuvant).

La compréhension de l'activation de la réponse immunitaire, notamment le trafic des lymphocytes et la génération d'une mémoire immunitaire efficace est ici primordial. C'est pourquoi, suite aux données préliminaires obtenues, le modèle expérimental chez la souris est indispensable et ne peut pas être remplacé. En effet, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types des cellules avec une activation des cytokines permettant la communication entre les cellules qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*. Toutefois, toutes les expérimentations sont planifiées suivant la règle des 3R "Réduire, Remplacer et Raffiner", de manière à utiliser le moins d'animaux possible permettant d'obtenir des résultats exploitables statistiquement des diverses expériences. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée contribuent au bien-être animal pour réduire toute douleur, souffrance ou dommage que pourraient ressentir les animaux. Ce projet nécessitera l'utilisation de 276 souris au maximum.

16250 Le lupus systémique (LS) est une maladie auto-immune pouvant affecter divers organes. Des facteurs environnementaux et génétiques ont été mis en lien avec la maladie chez les adultes alors que les LS à début pédiatrique peuvent être causés par une mutation d'un seul gène. Afin d'identifier des mutations impliqués dans la maladie, une analyse génétique à grande échelle a été réalisée sur une cohorte de patients atteints de LS pédiatrique. Des analyses bio-informatiques ont permis d'identifier chez plusieurs patients des mutations potentiellement causales notamment dans le gène X codant pour la protéine X. Afin d'étudier le développement de la maladie, des souris transgéniques portant la même mutation que celle qui est retrouvée chez les patients ont été générées et ont permis de mettre en évidence de manière concrète que cette mutation induisait le développement d'un phénotype auto-immun chez la souris. Ce phénotype serait causé par une altération des cellules du système immunitaire. Afin de vérifier cette hypothèse, des greffes de moelle osseuse vont être réalisées sur des souris transgéniques (porteuses de la mutation dans le gène X) à partir de moelle osseuse provenant de souris saines. L'injection de moelle osseuse permet de reconstituer le système immunitaire. Si le phénotype auto-immun des souris porteuses de la mutation X est inversé lorsqu'elles ont reçu de la moelle osseuse de souris saines, cela signifie que la maladie est bien due à l'effet de la mutation X dans les cellules du système immunitaire.

Une autre option envisagée pour les patients serait l'utilisation de la thérapie génique à partir de leurs propres cellules de la moelle osseuse. Dans un premier temps, cette étude sera réalisée sur les modèles murins. Pour se faire, il est nécessaire de connaître le pourcentage de cellules saines permettant de inverser le phénotype auto-immun des souris porteuses de la mutation X. Des souris dites chimères ayant différents pourcentages de cellules saines et de cellules avec la mutation X vont être générées, afin de connaître le nombre nécessaire de cellules saines permettant de inverser le phénotype auto-immun.

Enfin, l'utilisation d'une approche pharmacologique, moins invasive pour les patients, est également envisagée. La mutation du gène X retrouvée chez les patients code pour la protéine X qui semble avoir un rôle clé chez des cellules immunitaires spécifiques, les lymphocytes B. De nombreux médicaments ciblant les lymphocytes B sont déjà présents sur le marché. Avant d'envisager une approche pharmacologique contre ces cellules, il est nécessaire de démontrer le rôle inhérent des lymphocytes B avec la mutation du gène X dans le développement de l'auto-immunité. Pour cela, des souris constituées d'un système immunitaire sain avec des lymphocytes B provenant de souris avec la

mutation X vont être générées. L'observation d'un phénotype auto-immun chez ces souris confirmera l'importance de la mutation dans les lymphocytes B.

Ce type de projet ne peut être mené sans utiliser d'animaux car le système immunitaire est extrêmement complexe avec une multitude de cellules constamment en mouvement et organisées en un réseau tridimensionnel impossible à reproduire *in vitro*. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Le nombre de souris a été calculé afin que les résultats aient une valeur statistique malgré les variations entre les animaux, tout en évitant les mises à mort inutiles. Le nombre d'animaux est donc estimé à 72 souris sur 3 ans. Par ailleurs, les procédures utilisées dans ce projet n'occasionnent qu'une douleur et une angoisse réduites pour les animaux. Toutefois, afin de minimiser la douleur de l'animal, les animaux seront anesthésiés lors des procédures expérimentales. De plus, les animaux seront suivis tout au long de la procédure expérimentale. Un suivi utilisant un score permettra de surveiller le bien-être de l'animal. Un score élevé constituera alors un point limite.

16251 L'hyperplasie congénitale des surrénales est une maladie héréditaire due à l'inefficacité d'une protéine, la 21-hydroxylase (CYP21), à cause de mutations dans son gène. Ce déficit entraîne une production anormale des hormones par les glandes surrénales. La forme la plus sévère se caractérise par une déshydratation avec perte de sel pouvant conduire, en l'absence de traitement approprié, au décès du patient, en particulier chez le nouveau-né. Les deux sexes sont touchés, développant une puberté précoce accompagnée d'un arrêt de la croissance. Chez les filles, une surproduction d'androgènes (hormones mâles) entraîne une ambiguïté sexuelle et une virilisation chronique. Actuellement, le seul traitement existant est un traitement hormonal substitutif, devant être pris plusieurs fois par jour et à vie. Celui-ci s'avère très contraignant dans le quotidien des patients, déjà lourdement impactés par les conséquences physiologiques de la maladie. Par ailleurs, ce traitement ne bloque pas suffisamment la synthèse des hormones masculinisantes pour éviter la virilisation des filles.

L'objectif du projet est de finaliser les essais de thérapie génique réalisés ces dernières années sur le primate non humain ainsi que sur un modèle de souris présentant la maladie et visant à rétablir la synthèse d'une CYP21 fonctionnelle par administration d'une copie normale du gène, de façon à rétablir la production hormonale des glandes surrénales.

Nos premiers travaux ont permis de prouver que l'introduction d'une copie fonctionnelle du gène chez des souris déficientes pour CYP21 permettait une production de la protéine CYP21 en quantité faible mais suffisante pour améliorer significativement l'état général des animaux (prise de poids, taux hormonaux se rapprochant de ceux des souris normales).

Ce projet vise à démontrer qu'une unique injection du vecteur clinique (un virus non pathogène permettant le transfert du gène normal au sujet malade et qui sera utilisé en phase I sur des patients adultes) permet, chez notre souris modèle, une prise de poids reflétant la compensation du déficit en 21-hydroxylase. Le traitement doit permettre d'améliorer la réponse au stress (analyse de leur curiosité ou de leur anxiété dans un environnement nouveau), de rétablir des niveaux d'hormones comparables aux souris saines (comparaison des taux sanguins d'hormones avant et après l'injection ou dans les urines récupérées régulièrement). Le projet vise aussi à déterminer la persistance du vecteur et de ses effets, ainsi qu'à évaluer ses effets sur de jeunes sujets en vue des essais chez les enfants.

Nous testerons aussi chez notre souris modèle un second vecteur, en cours de développement, capable de s'exprimer plus spécifiquement dans les glandes surrénales. Avec ce nouveau vecteur, nous espérons induire une production plus importante de la protéine CYP21 au niveau des glandes surrénales, ce qui permettrait de diminuer les doses du traitement à injecter aux patients.

L'utilisation du modèle souris se justifie par le fait qu'il existe une souche avec un défaut génétique induisant un déficit en 21-hydroxylase. Chez ces souris, les caractéristiques de la maladie sont très similaires à celles observées chez l'humain (taux d'hormones, perte de sel, taille) et leur correction par le traitement peut être étudiée facilement. C'est l'unique modèle animal de la maladie connue. La génération d'animaux porteurs de ce défaut de CYP21 (par croisement d'animaux hétérozygotes non malades) est une étape nécessaire pour tester l'efficacité d'un traitement.

L'évaluation fonctionnelle du traitement sera étudiée par des techniques indolores et non-invasives (pesées, études comportementales).

Une observation quotidienne des animaux, des pesées hebdomadaires et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet (184 animaux comprenant 144 animaux présentant la maladie et 40 animaux contrôles) sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet thérapeutique du traitement.

Remplacement : Des études *in vitro* sur des cellules de surrénales déficientes en 21-hydroxylase ont déjà été menées. Cependant, elles ne nous permettent pas d'évaluer l'efficacité de la protéine produite à l'échelle d'un organisme vivant, dans le contexte d'une physiologie complexe des glandes endocrines. Ces études ne permettent pas de vérifier si la protéine est produite en quantité suffisante pour corriger la maladie, si elle est suffisamment efficace pour corriger tous les paramètres physiologiques, ou encore si cette correction est-elle durable dans le temps.

Réduction : La mutation génétique entraîne une mort prématurée des souriceaux présentant la maladie, dans les premiers jours suivants leur naissance, comme cela peut se produire chez l'humain.

Un traitement hormonal administré aux souris gestantes dans l'eau de boisson (aucune manipulation des animaux et ne modifiant pas son appétibilité), et aux souriceaux par voie sous-cutanée, dès la naissance, est indispensable à la survie des souriceaux malades.

Ces traitements substitutifs, ainsi que les mesures pour prévenir le rejet des petits par les mères, visent à limiter les décès des malades et donc le nombre de petits à faire naître pour constituer des groupes d'animaux malades auxquels sera administré le vecteur thérapeutique.

Les effectifs des groupes pour tester les traitements de thérapie génique seront réduits au minimum, notre expérience nous permettant d'évaluer leur efficacité sur 8 animaux par groupe au maximum. Les données des souris contrôles obtenues lors de la première partie du projet nous serviront autant que possible pour la suite du projet de façon à limiter ces groupes contrôles.

Raffinement : Il est important de procéder à l'injection d'hormones de substitution aux nouveau-nés aussi rapidement que possible après la naissance, dans les 24h qui suivent la mise-bas. Ce traitement des nouveau-nés nécessite une manipulation régulière des petits durant leurs premiers jours de vie. Bien que le geste soit peu invasif et rapide, c'est un facteur de stress pour les nouveau-nés et pour la mère. Des règles précises sont préconisées pour l'administration du traitement et le nombre d'injections a été réduit au minimum afin de limiter la manipulation des petits sans pour autant risquer leur perte.

Pour l'administration des vecteurs thérapeutiques, des protocoles anesthésiques et d'analgésie adaptés seront mis en place selon la procédure et validés par le vétérinaire.

L'administration expérimentale (1 seule injection par animal) ainsi que les deux prélèvements sanguins, se dérouleront sous anesthésie générale par isoflurane.

16252 L'imagerie biphotonique dans la rétine in-vivo est encore un challenge technique à l'heure actuelle, surtout chez le rongeur, à tel point que seuls quelques laboratoires dans le monde sont capables de le faire à cause des aberrations optiques créées par les différents milieux de l'œil traversés par la lumière. En effet il faut compenser les déformations irrégulières de la cornée et du cristallin et tenir compte de la courbure extrême de la rétine des rongeurs (petit œil, grand rayon de courbure). Pour ces raisons deux grandes familles de techniques très onéreuses existent à ce jour qui doivent être ajoutées au microscope biphoton: soit un dispositif d'optique adaptative, soit via la fabrication et l'utilisation d'objectifs extrêmement onéreux. Ces techniques ne sont utilisables que sur une espèce donnée et il n'est pas possible de passer du modèle rat au modèle souris par exemple. La microscopie biphotonique repose sur l'imagerie de molécules fluorescentes qui sont soit injectées, soit exprimées par certaines cellules chez l'animal (ex: émission de fluorescence quand les neurones sont actifs). L'objectif scientifique de ce projet est de développer une nouvelle approche chirurgicale anesthésiée classée sans réveil sur 10 rats (brown norway) et 10 souris (7 C57BL/6 type sauvage et 3 C57BL/6 thy1-Gcamp6) pour s'affranchir de ces contraintes, démocratiser ce modèle encore inaccessible pour beaucoup et l'utiliser plus tard pour tester le développement de candidats médicaments. Nous

proposons de développer une approche chirurgicale ophtalmique consistant à retirer la cornée et le cristallin puis de reconstruire le globe oculaire avec un gel biocompatible optiquement transparent avant de le refermer le tout avec une lamelle de verre et ceci chez l'animal anesthésié. Ce faisant il devient donc possible d'imager en temps réel et en 3D le réseau vasculaire et l'activité neuronale de la rétine à l'aide de marqueurs fluorescents. L'avènement de ce modèle permettra plus tard d'étudier in-vivo la physiologie rétinienne mais aussi de tester le développement pharmacologique de candidats médicaments et d'étudier leur passage dans la rétine.

En imagerie des colorants permettant de marquer l'activité neuronale seront déposés sur la rétine (rat). Chez la souris ces marqueurs sont exprimés par une lignée génétiquement modifiée. Les animaux seront ensuite placés sous le microscope et injectés avec d'autres colorants permettant de marquer les astrocytes et le réseau vasculaire et en fin d'expérience les animaux sont mis à mort. L'objectif est d'obtenir et reproduire chez au moins deux animaux de chaque espèce une imagerie fonctionnelle (activité neuronale) et structurelle (astrocytes et réseau vasculaire) en 3D et en temps réel avec une forte résolution spatiale.

Nous nous efforcerons de respecter la règle des 3R: Remplacement: malheureusement le remplacement n'est pas envisageable dans ce projet car les modèles in-silico ne peuvent répondre à nos questions. Sur le volet Réduction nous proposons une approche avec des objectifs spécifiques à atteindre qui nous permettront d'utiliser moins d'animaux qu'initialement prévu. Nous commencerons par le modèle rat car il est plus gros et d'abord chirurgical plus facile. Une fois l'approche chirurgicale validée chez au moins deux individus nous arrêterons les expériences sur ce modèle et passerons chez la souris. Chez la souris nous utiliserons l'expérience acquise précédemment pour valider le modèle et dès cet objectif atteint chez les souris "sauvages" nous passerons chez les souris génétiquement modifiées pour l'enregistrement de l'activité neuronale devant être reproduite chez deux animaux. Le projet pourra alors prendre fin sans que la totalité des animaux soit utilisée. En terme de raffinement nous bénéficierons de l'aide d'un chirurgien rétinologue pour la partie chirurgicale et irons au-delà des recommandations en terme d'analgésie (collyres anesthésiques classiquement utilisés) en réalisant un bloc nerveux de l'œil comme utilisé chez l'homme de nos jours. L'utilisation de l'imagerie biphoton est également considérée comme un raffinement car elle permet d'enregistrer l'activité simultanée de centaines de neurones unitaires en comparaison avec les techniques électrophysiologiques (électrodes) plus invasives. Enfin l'hébergement des animaux avant l'expérimentation se fera en insistant sur l'aspect social et l'enrichissement et aucune restriction ne sera opérée.

16253 Le diabète de type 1 (DT1) constitue un enjeu majeur de santé publique. Son incidence augmente de ~4% chaque année. Il touche surtout les enfants et les jeunes adultes, avec des traitements contraignants à vie et des complications graves sur le long terme. Il s'agit d'une maladie auto-immune. Le système immunitaire s'attaque de façon anormale à l'insuline et à d'autres protéines produites par les cellules bêta pancréatiques (appelées antigènes), menant à leur destruction.

Aujourd'hui on peut seulement remplacer l'insuline par des injections, alors qu'il faudrait intervenir sur le système immunitaire. Il faut donc développer des outils thérapeutiques qui soient capables de neutraliser la réponse auto-immune contre les cellules bêta. Il s'agit là de l'objectif de notre projet de recherche. Grâce à l'expérimentation sur des souris qui développent un DT1, nous souhaitons évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique que nous avons mis au point. Nous privilégions une administration des produits par voie orale, rendant ainsi notre stratégie non-invasive attractive pour une application chez l'Homme.

Le projet examinera :

1) Deux types de traitements utilisant l'insuline et d'autres protéines pancréatiques, sous leur forme naturelle ou 'déguisées' en anticorps, ce qui leur confère la capacité de traverser la barrière intestinale après administration orale.

2) L'administration à deux moments de la vie : néonatale, adulte (avant l'apparition du DT1).

3) Quatre modèles de souris complémentaires : un modèle transgénique, mieux adapté pour étudier les mécanismes thérapeutiques ; deux modèles physiologiques, proches de la maladie humaine ; et un

modèle humanisé créé pour ce projet, afin de reproduire l'interaction entre le vaccin et son récepteur humain.

Le succès de la vaccination orale sera déterminé par des mesures de glycosurie et/ou glycémie (glucose dans les urines ou le sang). Les souris traitées seront suivies pendant plusieurs semaines pour analyser l'incidence de la maladie. Les souris non diabétiques seront alors considérées comme protégées du diabète. On détermine ainsi l'efficacité des traitements proposés. Les souris devenant diabétiques seront mises à mort afin d'abrèger leur souffrance.

Au total, nous estimons à 1076 le nombre de souris nécessaires à la complétion de ce projet prévu 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 vaccinales proposées. Dans cet optique de thérapie, l'expérimentation sur animal vigile est essentielle et ne peut être substituée par des approches *in vitro* qui ne reproduisent pas les différents stades de développement du DT1. En revanche, des expériences seront menées *in vitro* pour mieux comprendre les mécanismes biologiques induits par les thérapies utilisées. Une attention particulière sera portée au bien-être animal (propreté de la litière, réserve d'eau dans le biberon, enrichissement, méthodes d'anesthésie générale si nécessaire) et un suivi attentif des souris basé sur des points limites définis, entraînant si nécessaire, la mise à mort anticipée de l'animal. Si elle est efficace, cette stratégie par voie orale pourra aboutir rapidement à des essais cliniques, pour lesquels nous constituons d'ores et déjà des cohortes de patients adaptées.

16254 Les nanomatériaux (composés de particules < 100nm) sont de plus en plus présents dans le secteur de l'agroalimentaire, notamment dans les aliments en tant qu'additifs. Parmi ces nanoparticules, le dioxyde de titane (TiO₂) est un additif alimentaire (référéncé E171) utilisé comme colorant/opacifiant et agent de brillance dans les confiseries, les aliments transformés, les sauces et le glaçage. Ces propriétés bactéricides, lui permettent aussi d'être utilisé dans le secteur de l'emballage alimentaire. L'exposition orale humaine à cet additif est chronique (environ 10 mg/kg/jour selon l'autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments), ce qui soulève des questions de santé publique. Ces interrogations reposent sur les effets génotoxiques, de stress oxydant et inflammatoires des nanoparticules de TiO₂ observés sur cellules intestinales. Pour autant, la toxicité orale du TiO₂ est encore peu étudiée et les autorités sanitaires demandent des tests pour évaluer les risques pour la santé des additifs alimentaires contenant des nanoparticules. Après ingestion, le TiO₂ est capable d'interagir avec le microbiote intestinal avant de traverser la barrière épithéliale intestinale et d'interagir avec les cellules immunitaires, induisant divers effets délétères pour l'hôte. Le microbiote joue un rôle clé dans plusieurs fonctions physiologiques telles que les fonctions digestives, métaboliques et immunitaires. Une altération du microbiote intestinal (appelée dysbiose) est associée à différentes maladies telles que l'obésité et le cancer colorectal (CCR). Du fait des propriétés antibactériennes du TiO₂, une exposition chronique au E171 est susceptible d'induire une dysbiose capable de favoriser le développement de ces maladies.

Le but de ce projet est d'étudier le lien entre l'exposition orale chronique au E171 et l'apparition et/ou l'aggravation de désordres métaboliques et de CCR en évaluant l'impact du TiO₂ sur la composition et l'activité métabolique du microbiote et ses conséquences sur la barrière intestinale, la réponse immune, l'homéostasie métabolique et l'initiation des lésions pré-néoplasiques coliques.

Pour ce projet des souris adultes seront exposés pendant 100 jours à des doses de E171 encadrant l'exposition humaine. L'additif sera incorporé dans un régime normal ou un régime riche en lipide. La composition et l'activité métabolique du microbiote, ainsi que la barrière intestinale, la réponse immune, l'homéostasie métabolique et l'initiation des lésions pré-néoplasiques coliques seront étudiés. Le rôle du microbiote intestinale dans les effets délétères sera évalué par des approches d'antibiothérapies et de transfert de microbiote.

Ce projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R et nécessitera 1296 souris sur une durée de cinq ans, les modèles alternatifs ne permettant pas de recréer la complexité des dialogues microbiote-hôte. Le nombre de souris a été réduit au minimum requis par les tests statistiques et pouvoir exploiter les résultats. Ensuite, le bien-être animal sera pris en compte par la mise en place d'un enrichissement des cages, par ajout de dispositif de nidification et de petites maisonnettes, ainsi qu'un hébergement

en groupe des animaux. Mais aussi par l'utilisation de crème anesthésiante à usage local pour une des procédures. Enfin, des points limites seront définis et une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée. Toutefois, si malgré toutes les mesures prises pour réduire le stress au minimum, une souffrance est constatée, la procédure sera systématiquement arrêtée.

16255 Grâce aux avancées réalisées dans le cadre du traitement du cancer, la durée de vie des patients s'est considérablement améliorée. La radiothérapie (RT) est pratiquée annuellement sur des centaines de milliers de sujets atteints de tumeurs cérébrales (TC). Cependant, des troubles cognitifs, qui altèrent dramatiquement la qualité de vie des patients, sont rapportés de façon croissante par les patients traités. Ainsi, la modélisation des déficits cognitifs radio-induits et l'analyse de leurs mécanismes sous-jacents ont suscité de nombreuses études précliniques ces dernières années. Néanmoins, les modèles animaux utilisés ainsi que les paradigmes de RT appliqués s'éloignent souvent de la réalité clinique. En effet, dans la majorité des études précliniques, une RT panencéphalique est pratiquée sur le cerveau sain ne présentant pas de TC. Or il est important de prendre en compte la composante tumorale, ayant des effets propres en réaction à son irradiation. De plus, en clinique, grâce aux développements récents de nouvelles approches de RT, celle-ci est de plus en plus pratiquée de façon ciblée. Ainsi, le projet vise à évaluer les effets d'une irradiation focalisée du tissu cérébral sur les altérations cognitives et les atteintes structurelles et fonctionnelles du tissu cérébral.

Cette étude sera réalisée en suivant le principe des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer). Raffiner : les animaux seront hébergés aux normes requises, avec un ou plusieurs enrichissements dans les cages; 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 rat représente un modèle de choix pour étudier les effets de l'irradiation sur le cerveau et sur les performances cognitives. Le nombre estimé d'animaux utilisés est de 100 rats répartis en 5 groupes.

16256 Dans les pays développés, près d'une femme sur huit sera concernée le cancer du sein, le risque augmentant avec l'âge. Certains cancers du sein (1 sur 5 environ) sont plus agressifs, car les cellules de la tumeur surexpriment à leur surface le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2). Cette surexpression est particulièrement néfaste pour le pronostic des patientes qui présentent alors généralement une évolution rapide de la maladie (rechutes, survenue de métastases et résistance aux traitements conventionnels).

Ces dernières années, l'introduction de nouveaux traitements à base d'anticorps (mAb) anti-HER2 tels que le trastuzumab (Herceptin®) et le conjugué anticorps-médicament (ADC) trastuzumab-emtansine (T-DM1, Kadcyla®) a considérablement amélioré la survie globale des patientes. Cependant, le T-DM1 se présente comme un mélange hétérogène d'immunoconjugués, ce qui compromet sa fenêtre thérapeutique. De plus, une résistance acquise au T-DM1 est fréquemment observée. Néanmoins, certaines résistances aux traitements apparaissent et il est urgent d'avoir accès à de nouvelles thérapies ciblées dans ce contexte, l'association des compétences complémentaires de trois laboratoires partenaires a permis la conception, le développement et l'évaluation *in vitro* de nouveaux ADC à base de différents fragments d'anticorps, afin d'optimiser l'acheminement des cytotoxiques anticancéreux vers la cible tumorale.

Le projet proposé interviendra après l'étape de validation *in vitro* de l'affinité des fragments d'anticorps vis-à-vis de la cible HER2. Il aura pour objectif d'évaluer *in vivo* la biodistribution de quatre fragments mAb sur modèle murin de cancer du sein HER2+.

La règle des 3R sera scrupuleusement respectée.

Remplacement : Suite aux études *in vitro*, la validation préclinique du ciblage *in vivo* des tumeurs HER2+ est absolument nécessaire et les études sur cellules ne peuvent se substituer aux études sur un organisme entier. Il n'y a donc pas d'alternatives.

Raffinement : le modèle animal choisi est reconnu par la littérature pour reproduire les caractéristiques de la pathologie humaine. La surveillance quotidienne des animaux permettra de détecter 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).

Réduction: Le nombre d'animaux par groupe (4) a été réduit au maximum et permettra l'exploitation des résultats. Ce nombre a été calculé afin de garantir une signification statistique à l'étude menée. Le nombre total d'animaux est de 96 souris maximum sur une période de 5 ans.

16257 Les déficiences intellectuelles (DI) affectent approximativement 1 à 3% de la population dans les pays développés. Malgré des avancées récentes dans le domaine de la génétique, la cause du handicap mental reste inexpliquée dans près de la moitié des cas, laissant les familles sans diagnostic précis. De plus, il n'existe à ce jour aucun traitement pour la quasi-totalité de ces pathologies. Une des causes de DI est liée à la présence d'anomalie de développement de la partie postérieure du cerveau, appelée cervelet. Chez les enfants atteints, ces anomalies se traduisent notamment par des troubles moteurs et cognitifs. L'utilisation des modèles murins a pour but de mieux comprendre les mécanismes cellulaires en cause à travers l'étude de plusieurs pathologies touchant la mise en place du cervelet. Comme il n'est pas possible d'accéder aux tissus affectés chez les patients pour réaliser de telles études, il est nécessaire d'avoir un modèle dont l'organisation et le développement du cerveau et du cervelet soient proches de ceux de l'homme. La conservation importante de ces structures chez la souris, fait de celle-ci un modèle de choix pour comprendre ces mécanismes.

Nous souhaitons étudier des modèles souris mutées pour des gènes impliqués dans des pathologies. Les protéines produites par les gènes qui seront étudiés sont un canal calcique et une enzyme impliquée dans le métabolisme d'un sucre, l'inositol. Pour un de ces gènes, des résultats préliminaires obtenus sur modèle cellulaire ont montrés une accumulation de fer en présence du gène muté. Nous faisons l'hypothèse qu'une accumulation de fer pourrait être impliquée chez les patients porteurs de mutation dans le même gène. Pour tester cette hypothèse, les souris gestantes et leurs portées recevront une nourriture enrichie en fer. Le cervelet des souris sera étudié à 7 stades de développement différents, en comparaison avec celui de souris non mutées. Des approches histologiques, de biologie moléculaire et biochimiques seront ensuite utilisées pour caractériser le phénotype et identifier des bio-marqueurs. Des résultats préliminaires et des études par culture cellulaire ont permis au préalable de cibler les processus cellulaires à étudier et de réduire le nombre d'animaux. Le nombre de souris a été défini pour utiliser le minimum d'animaux possible afin d'obtenir des résultats statistiques significatifs. Par la suite, une recherche d'approche thérapeutique est envisagée en utilisant dans un premier temps les cellules neuronales de ces souris. Un maximum de 382 souris seront étudiées aux stades précoces de l'apparition de la maladie, avant la mise en place de troubles neurologiques sévères potentiels.

Le projet prévoit donc l'utilisation de 382 souris au total sur 4 ans. 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 l'étude des tissus cérébraux, qui présentent des caractéristiques uniques. Le protocole expérimental respecte la règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement. Les souris seront surveillées quotidiennement, les procédures se feront sous anesthésie générale, avec utilisation d'antalgiques, et des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Ce projet doit permettre d'améliorer le diagnostic de ces pathologies et d'identifier des pistes thérapeutiques, potentiellement testables dans le futur, grâce aux modèles générés.

16258 L'importance des interactions entre un hôte et son microbiote intestinal est connue de longue date. Ce champ d'investigation a connu ces dernières années des avancées sans précédent, notamment chez les animaux d'élevage, car le microbiote intestinal est au carrefour de fonctions physiologiques majeures sous-jacentes à de nombreux caractères d'intérêt (santé et immunité, croissance, efficacité

alimentaire, bien-être, etc.). L'identification de leviers permettant d'orienter les microbiotes des animaux d'élevage offre des perspectives originales et extrêmement intéressantes pour mieux utiliser des ressources alimentaires plus variées, réduire les rejets, diminuer l'usage des antibiotiques, améliorer la santé et le bien-être animal, et contribuer ainsi à améliorer la durabilité de l'élevage.

Le tube digestif, stérile *in utero*, est colonisé après la naissance par des espèces microbiennes qui se diversifient progressivement pour s'organiser en un écosystème qui reste relativement stable au cours de la vie. Comprendre comment se façonne le microbiote d'un individu est capital pour savoir ensuite comment le moduler. L'environnement de naissance et l'alimentation sont connus comme des déterminants importants. La génétique de l'hôte joue également un rôle, mais son étude reste complexe car le microbiote est à la fois un phénotype et un environnement pour son hôte. Le microbiote est en effet un écosystème dynamique qui va co-évoluer avec son hôte. De plus, la plupart des études réalisées jusqu'à présent n'ont pas permis de dissocier de façon rigoureuse la variabilité liée à la génétique de l'hôte des effets génétiques et environnementaux liés à la transmission du microbiote maternel à la naissance. Une démonstration formelle des possibilités d'évolution hôte/microbiote par sélection directionnelle sur plusieurs générations est nécessaire pour avancer sur ces questions.

Le projet vise, grâce à la mise en œuvre d'une sélection directionnelle sur la composition du microbiote, à mieux comprendre son déterminisme génétique et ses modalités de transmission pour, à terme, proposer cette voie pour l'amélioration en élevage de la santé et du bien-être des porcs. L'expérimentation sera conduite sur 480 porcs de race Large White, répartis en deux générations successives, avec une étape de sélection des reproducteurs. L'estimation de la réponse à la sélection permettra d'affiner nos connaissances sur les interactions entre l'hôte et son microbiote et sur leur co-évolution.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur le porc sont requises car il s'agit de l'espèce cible. L'objectif est d'explorer le déterminisme génétique de la composition du microbiote à des fins de sélection, notamment pour améliorer la santé et le bien-être des animaux. Réduction : le nombre d'animaux du protocole a été déterminé statistiquement afin de disposer du nombre adéquat d'échantillons pour valider la réponse à la sélection dans le cadre d'une sélection directionnelle tout en maintenant de la diversité génétique. Raffinement : les animaux sont élevés dans les conditions réglementaires définies pour l'élevage porcin pour les études à visée agronomique. Les méthodes de prélèvements employées sont peu ou pas invasives et sont mises en œuvre par un personnel expérimenté de façon à limiter le temps d'intervention et le stress des animaux.

16259 Chez le poulet de chair, la sélection sur les performances de production a conduit à des animaux très efficaces mais également plus sensibles aux variations environnementales et globalement moins robustes. Ainsi, la phase de démarrage des animaux est devenue particulièrement critique à gérer pour les éleveurs et le recours aux antibiotiques reste encore trop fréquent dans les toutes premières semaines de vie des animaux. Il est donc primordial de chercher à améliorer la robustesse des animaux de manière très précoce en améliorant notamment la qualité du poussin. Ceci implique de mieux l'objectiver, en allant au-delà d'une appréciation visuelle relativement subjective et qui ne rend pas compte des multiples composantes de cette qualité. Tel est l'objectif de notre projet de recherche c'est à dire identifier de nouveaux indicateurs et biomarqueurs de la qualité du poussin. Dans une première partie du projet ont été identifiés plusieurs indicateurs et biomarqueurs, en lien avec la croissance, le métabolisme ou l'état de santé et de stress des poussins. Nous proposons dans ce second volet du projet d'étudier leur contrôle par la génétique dans la perspective d'identifier de nouveaux critères d'intérêt pour la sélection pour une meilleure qualité du poussin. Le projet tirera profit de deux lignées de poulet de chair qui présentent une différence de qualité du poussin dès l'éclosion et des profils d'évolution de la qualité du poussin différents après un challenge de démarrage. Ces mêmes conditions perturbées au démarrage (procédure expérimentale 1) seront appliquées pour l'analyse du déterminisme génétique de la qualité du poussin, qui implique également le prélèvement de sang à J7 pour la mesure de biomarqueurs (procédure expérimentale 2).

REMPACEMENT : Compte-tenu de l'objectif du projet qui vise à proposer des améliorations pour l'élevage, le modèle animal ne peut être substitué par des modèles d'étude *in vitro* qui ne permettraient pas de prendre en compte les réponses sur l'animal entier.

REDUCTION : Pour être suffisamment robustes et permettre une estimation précise des paramètres génétiques (héritabilités et corrélations génétiques) des caractères analysés, les études de génétique nécessitent des effectifs animaux relativement importants, de l'ordre de quelques centaines. Dans cette étude, nous nous situerons dans la fourchette basse en termes d'effectifs animaux, puisque seront phénotypés un total de 320 animaux. Cet effectif permettra un compromis entre une estimation suffisamment précise des paramètres génétiques des caractères étudiés, les possibilités expérimentales de mesures des différents indicateurs et biomarqueurs et le souci de réduire le nombre des animaux mis en expérimentation.

RAFFINEMENT : Les animaux seront élevés en faible densité en groupe et au sol, sur un lit de copeaux et avec des enrichissements de type perchoirs; les animaux auront la possibilité d'explorer leur environnement. Dans cet essai, le système d'alimentation grâce à une mangeoire électronique permettra de suivre la consommation individuelle de chaque individu en même temps que son poids. De nos observations précédentes, ces conditions permettent un élevage sans stress des animaux qui ont la possibilité de se déplacer et de s'alimenter sans contrainte.

16260 Le syndrome de l'apnée du sommeil (SAOS) touche environ 30% de la population. Cette maladie fréquente est en constante progression en lien étroit avec le vieillissement de la population et l'épidémie d'obésité. Il semble que suite aux études épidémiologiques et faute de diagnostic, le SAOS reste sous-diagnostiqué. Le SAOS se manifeste par des interruptions répétées et incontrôlées de la respiration pendant le sommeil. Il en résulte des complications au niveau cardiovasculaire, métabolique et de la mortalité chez les personnes atteintes d'un cancer. Des études précliniques et cliniques révélant l'association du SAOS avec le syndrome métabolique et certaines atteintes hépatiques montrent que le foie est un organe cible des conséquences délétères de cette pathologie. Le cancer primaire du foie (CHC) est une maladie en pleine expansion avec actuellement plus de 8500 nouveaux cas par an en France et plus de 7000 morts par an. Le SAOS peut atteindre une incidence de 15% dans la population de plus de 70 ans, population présentant également une incidence maximale de cancer du foie. Mais l'influence du SAOS sur le développement du cancer du foie, ainsi que les mécanismes sous-jacents sont mal définis à ce jour.

Ce projet vise donc à étudier l'impact de l'apnée du sommeil sur le développement et la progression du CHC. Pour cela nous utiliserons trois modèles complémentaires de tumeurs hépatiques chez la souris immunocompétente. Nous comparerons le développement tumoral entre des souris soumises ou non à l'apnée du sommeil grâce à un dispositif expérimental adapté. Ce projet permettra aussi de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents. Il pourrait ainsi mettre en évidence la nécessité d'une surveillance plus étroite et rapprochée chez les patients atteints d'un cancer du foie et souffrant de l'apnée du sommeil.

Ce projet a été conçu dans une démarche éthique et avec une application du principe des 3R.

Remplacer : La carcinogenèse hépatique est un processus impliquant différents types cellulaires et des régulations systémiques non disponibles *in vitro*. Les lignées hépatocytaires tumorales humaines ne permettent pas de reproduire tout ce processus et les essais d'hypoxie intermittentes sur ces lignées n'ont pas permis d'atteindre nos objectifs. C'est pourquoi le remplacement des modèles animaux dans cette étude est actuellement irréalisable.

Raffiner : les animaux seront toujours hébergés en groupes avec un enrichissement du milieu. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. L'utilisation d'anesthésiant et/ou d'analgésique sera réalisée suivant les procédures décrites dans ce projet afin de réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Réduire : Un calcul des effectifs nécessaires basé sur une variable biologique simple (taille 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. Une procédure de mise au point des greffes sera réalisée en amont afin de réduire les groupes expérimentaux des procédures suivantes.

Nombre de souris pour cette étude : 148

16261 Afin de retirer de façon efficiente le foyer épileptique dans le cas des épilepsies résistantes aux traitements pharmacologiques (près de 30 % des épilepsies), il est nécessaire de l'identifier avec précision. Pour cela, les patients sont actuellement soumis à plusieurs examens préalables dont des Imageries par Résonance Magnétique (IRM), des électroencéphalogrammes de scalp (EEG) et des électroencéphalogrammes intracrâniens (iEEG). Cette dernière technique implique l'implantation d'électrodes dans le cerveau du patient et donc une chirurgie invasive qui n'est pas sans risque. Il est donc important de développer des solutions qui ne demandent pas d'intervention invasive.

Les techniques dites « -omique » se développent de plus en plus dans le domaine du diagnostic neurologique. La métabolomique est une méthode qui permet de mettre en évidence une signature métabolique caractéristique d'un état pathologique d'un tissu. A l'aide de la spectroscopie par résonance magnétique, il est possible de caractériser le profil métabolique d'une structure cérébrale mais également de localiser de façon précise la structure d'intérêt au sein de l'organe, de façon non invasive.

Le but de ce projet est donc d'utiliser la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) *in vivo* afin de mettre en évidence le profil métabolique de la zone à l'origine des crises d'épilepsie ou zone épileptogène (ZE) dans deux modèles d'épilepsie focale pharmaco-résistante chez la souris, chacun modélisant un type particulier d'épilepsie qui pose de réels problèmes en thérapeutique clinique. Ces profils métaboliques obtenus de façon non invasive *in vivo* seront confrontés à ceux de profils métaboliques obtenus au préalable *ex vivo* par RMN, sur des biopsies cérébrales provenant des mêmes modèles.

Ce projet est composé de trois procédures expérimentales.

Raffiner : Nous veillerons à utiliser les animaux de façon la plus éthique possible. Une prise en charge du stress et de la douleur sera mise en place. En effet, les animaux seront anesthésiés, analgésiés durant les interventions et les techniques d'imagerie que nous utiliserons dans nos procédures sont sans douleur pour l'animal et permettent de répéter les acquisitions.

Remplacer : L'utilisation de l'animal dans son intégrité est nécessaire pour répondre à notre question. Il n'existe aucun modèle cellulaire permettant de mettre en évidence un foyer épileptique dans le cerveau. Le développement d'une stratégie diagnostique telle qu'envisagée dans cette étude nécessite d'avoir recours à des modèles animaux dans lesquels le développement de foyers épileptogènes ont été clairement caractérisés et mis en évidence.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin de limiter le nombre d'animaux au maximum tout en permettant une exploitation statistique rigoureuse des résultats. Pour cela, en fonction de l'expérience acquise en modélisation animale des épilepsies, nous estimons que 320 animaux par modèle soit 640 animaux au total seront utilisés pendant 5 ans.

La RMN *in vivo* est une méthode non invasive qui, une fois évaluée et validée pour délimiter un foyer épileptique, pourrait permettre de limiter l'utilisation d'implantation d'électrodes intracérébrales.

16262 Exploiter le système immunitaire pour reconnaître et détruire les cellules tumorales est l'objectif central de l'immunothérapie contre le cancer. Au cours des dernières années, l'immunothérapie a connu des avancées majeures, il y a eu un intérêt accru pour l'optimisation de cette technologie afin d'en faire un traitement cliniquement réalisable.

L'une des modalités d'immunothérapie est l'utilisation d'anticorps. Certains anticorps reconnaissent et se fixent sur les cellules tumorales bloquant leur croissance (anticorps anti-récepteur à un facteur de croissance par exemple), soit les détruisent directement (anticorps armés d'un médicament toxique), D'autres anticorps ciblent les acteurs de la réponse immunitaire (lymphocytes T par exemple) pour stimuler ces derniers et les aider à détruire la tumeur (anticorps bloquant les points de contrôles du système immunitaire, tel que les anticorps anti-PD1).

Plus récemment, les anticorps dits bi-spécifiques (Bispecific T cell Engagers, BiTes) ont été développés et sont devenus une approche thérapeutique très prometteuse. Il s'agit de deux anticorps regroupés en une seule molécule. Des anticorps bi-spécifiques comme le Blinatumomab (Blinicyto) ciblent d'une part les cellules tumorales et d'autre part les lymphocytes T CD3+ créant un pont entre ces deux cellules (Figure 1). Ainsi, les lymphocytes T sont rapprochés physiquement des cellules tumorales et

ils sont activés via le CD3. En conséquence, ils vont détruire spécifiquement la cellule tumorale. Ces anticorps BiTes ont montré leur efficacité et sont utilisés aujourd'hui pour le traitement de certains lymphomes B (CD19+) chez les adultes et les enfants.

Toutefois, cette stratégie doit être optimisée car ces anticorps possèdent une toxicité importante due à l'activation de tous les lymphocytes. Ainsi, leur efficacité pourrait être améliorée en ne ciblant seulement que des sous-populations de lymphocytes d'intérêt.

Dans ce projet, nous allons comparer différentes stratégies de développement d'anticorps bispécifiques afin de trouver les plus efficaces contre les tumeurs et les moins toxiques pour le patient. L'efficacité sera largement testée par des expériences *in vitro*. Toutefois, pour réellement permettre l'analyse de la toxicité et de l'efficacité anti-cancéreuse ni les modèles expérimentaux *in vitro* ni les modèles mathématiques ne peuvent remplacer les expériences *in vivo* d'immunothérapie par injection des anticorps contre les tumeurs. Par conséquent, les réponses anti-tumorales seront analysées chez des souris immunodéprimées injectées avec des lignées tumorales humaines, des lymphocytes T humains et les nouveaux anticorps bi-spécifiques développés. Ce modèle de souris immunodéprimée a été choisi pour éviter le rejet des cellules humaines. Les expériences utilisant ce modèle animal 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 504 souris. La croissance tumorale est mesurée par imagerie, permettant un suivi longitudinal et non invasif des animaux et limitant leur nombre. Toutes les précautions ont été 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 selon des points limites précoces et prédictifs de l'apparition d'une souffrance des animaux.

16263 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.

16264 Le but de ce projet est de caractériser des biomarqueurs sanguins et tissulaires de la croissance osseuse pour le suivi d'efficacité d'un traitement pour l'achondroplasie, qui est la forme de nanisme la plus fréquente chez l'Homme. Cette maladie est due à des mutations du gène du récepteur 3 du facteur de croissance fibroblastique (FGFR3) encodant un récepteur transmembranaire important, entre autres dans la régulation de la croissance linéaire des os longs. Nous avons montré précédemment l'efficacité d'un traitement par protéine recombinante dans un modèle de souris achondroplasies mimant cette pathologie.

Nous utiliserons dans ce projet des souris sauvages et 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 d'identifier des biomarqueurs d'efficacité et de transposer leur utilisation chez l'Homme, et ainsi continuer le développement préclinique du médicament. Les projets précédents ont permis de sélectionner une molécule de référence qui a démontré son efficacité sur la croissance de souris nouveau-nées, et aussi de choisir les biomarqueurs sanguins pour le suivi d'efficacité du traitement.

Ce projet a comme objectif de tester plusieurs candidats optimisés de la molécule de référence ainsi que des molécules dites « de secours », soit environ 50 molécules pour continuer leur développement. Les résultats de ce projet permettront de transposer l'utilisation de ces traitements de façon plus adéquate chez l'enfant.

Ce projet aura des bénéfices pour l'Homme. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'achondroplasie. Ce potentiel traitement permettrait de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications liées à cette pathologie, notamment les paralysies au niveau de la moelle épinière.

Afin de satisfaire aux exigences de la règle des 3R, nous avons mis en place différentes stratégies pour ce projet.

Tout d'abord dans un but de remplacement nous avons choisi les molécules optimisées après avoir réalisé des expériences sur cellules afin de ne tester chez l'animal que les molécules présentant un potentiel thérapeutique élevé.

Dans un but de raffinement, une première partie des expériences est réalisée sur des animaux sauvages ce qui permet de réduire la variabilité et donc le nombre d'animaux à utiliser, ainsi que le nombre de molécule à tester dans le modèle transgénique à phénotype dommageable. Le traitement présente une efficacité sur la croissance osseuse chez les souris WT, ce qui nous permet de réaliser

un screening plus large avant d'utiliser des souris transgéniques à phénotype dommageable pour terminer la validation des traitements.

Dans un but de réduction, nous allons randomiser la distribution des animaux transgéniques par groupe selon leur poids, il y a en effet une corrélation directe entre poids et génotype avant le traitement pour réduire considérablement le nombre d'animaux à utiliser. Enfin dans un but de raffinement des expériences, nous réalisons une évaluation précise de l'état des animaux au cours des procédures expérimentales grâce à des grilles de suivis et l'établissement de points limites précoces.

Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives avec un environnement enrichi (igloos, briques de bois à grignoter, buchettes, commutation progressive de la lumière et interactions fréquentes avec les humains...). Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum.

Des points limites préalablement définis et adaptés permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de préserver leur bien-être. En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée.

Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 10950 souris soit 500 souris dans la procédure 1, 2375 souris dans la procédure 2, 3800 souris dans la procédure 3, 4275 souris dans la procédure 4 sur une période de 5 ans.

16265 La maladie d'Alzheimer (MA) est la démence la plus fréquemment diagnostiquée. Il s'agit d'une maladie neurodégénérative avec forte prévalence chez les personnes âgées. La MA apparaît le plus souvent après l'âge de 65 ans où elle concerne environ 3 personnes sur 100 de cette tranche d'âge. Elle augmente rapidement pour atteindre plus de 20 personnes sur 100 de la population âgée de plus de 80 ans. Néanmoins, plus de 65 000 personnes de moins de 65 ans en France sont atteintes de la MA ou d'une maladie apparentée. A ce jour, la MA est un enjeu majeur de santé publique.

Nous savons que la MA est associée à une disparition progressive des neurones et des contacts qu'ils établissent entre eux (on parle de contacts synaptiques) dans les régions du cerveau qui gèrent certaines capacités, dites cognitives, comme la mémoire, le langage, le raisonnement ou encore l'attention. Du fait de cette disparition des neurones et de leurs contacts, un certain nombre d'actions ne peut plus être programmé correctement. Ainsi, certaines facultés sont altérées et réduisent peu à peu l'autonomie de la personne. Cette disparition progressive des neurones est aussi associée à des processus moléculaires, qui consistent en une flambée de l'inflammation au niveau du cerveau, et à deux types de lésions : le dysfonctionnement d'une protéine essentielle aux neurones appelée « Tau », qui s'accumule sous une forme dite « phosphorylée », et l'apparition de plaques dites « séniles » dues à une autre protéine « bêta amyloïde ». En raison de leur diversité et de leur sévérité, ces processus moléculaires représentent le plus grand obstacle dans le développement de traitements efficaces pour la maladie.

Ce projet vise à explorer les bienfaits d'un nouveau candidat médicament d'origine lipidique, sélectionné à la suite d'études *in vitro*. Ainsi, les objectifs de ce projet de recherche translationnelle, sont d'étudier dans un modèle murin de la maladie, les effets de cette molécule sur: 1) les troubles cognitifs et comportementaux associés à la MA, 2) la formation des plaques « séniles », et 3) le niveau inflammatoire cérébral. Ce protocole ne comporte qu'une seule procédure de classe modérée.

Pour cela, le modèle de souris transgénique (Tg2576 ; Taconic) de la MA sera utilisé (souris TG). Les souris établies sur même fond génétique, mais n'exprimant pas le transgène responsable de la maladie, seront utilisées comme contrôles (souris WT). L'étude comprendra 4 groupes expérimentaux (2 groupes TG, 2 groupes WT), chacun composé de 20 souris mâles, la moitié des souris TG et la moitié des souris WT recevant le candidat médicament. Les premiers signes cliniques comportementaux apparaissant aux alentours de l'âge de 10 mois, alors que certains marqueurs cérébraux font état d'une altération dès le 4^{ème} mois, le candidat médicament sera administré tous les 2 jours à partir du 6^{ème} mois, et ce jusqu'à la fin de l'étude qui s'achèvera à l'âge de 11 mois ou de 13 mois, pour les souris dont le cerveau servira aux études histologiques ou électrophysiologiques, respectivement.

Les expérimentations consisteront à évaluer aux âges de 10 et 11 mois, les capacités cognitives et comportementales des souris, à l'aide de tests appropriés (labyrinthes aquatiques et en zéro, test de reconnaissance d'un nouvel objet). A de l'âge de 11 mois, les cerveaux de 12 souris de chaque groupe

seront prélevés pour des analyses de marqueurs histologiques (n=5/12) ou biochimiques (n=7/12) de la maladie. Les 8 autres souris de chaque groupe continueront à être traitées, jusqu'au jour de leur utilisation pour réaliser des études électrophysiologiques *ex vivo*. Ainsi, entre l'âge de 12 et 13 mois, une souris par jour sera utilisée appartenant à l'un des 4 groupes expérimentaux du départ. Pour ce protocole, les 80 souris seront donc mises à mort soit à l'âge de 11 mois, soit entre les âges de 12 et 13 mois.

Dans sa conception, le projet a pris en compte la règle éthique des 3R :

Remplacement : Compte tenu du fait que la MA regroupe une diversité de syndromes, il existe à ce jour très peu d'alternatives permettant d'évaluer les différents aspects de la pathologie sur des modèles *in vitro* ou *ex vivo*. Toutefois, en amont des tests *in vivo*, des études *in vitro* ont été réalisées pour sélectionner le candidat médicament pour ses propriétés anti-inflammatoires. Elles devront toutefois être vérifiées *in vivo*. De plus, l'analyse de comportements complexes, comme ceux de l'anxiété et de l'apprentissage spatial, ne peuvent être appréhendés au niveau préclinique autrement qu'*in vivo* chez des vertébrés, et ne peut aujourd'hui être remplacée par des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico*.

Réduction : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 80 souris (40 Tg2576 et 40 contrôles) sur une durée de 3 ans. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum tout en ne compromettant pas l'atteinte des objectifs de l'étude. Il a été déterminé à l'aide d'outils statistiques, en tenant compte des résultats d'études antérieures dans le laboratoire visant à étudier les mêmes variables (inflammation, cognition).

Raffinement : Les animaux mâles arriveront suffisamment tôt pour permettre deux semaines d'acclimatation avant le début des procédures. Ensuite, le planning expérimental a été établi de sorte à prendre en compte, chez la souche de souris TG, l'apparition des symptômes de la maladie. Le poids des souris sera suivi 2 fois par semaine (au moment de l'administration du traitement), et les animaux seront soumis à une surveillance attentive, pour limiter au maximum stress et douleur, et apporter des soins adaptés, le cas échéant. Enfin, nous nous efforcerons à chaque instant de raffiner nos procédures afin d'optimiser le bien-être des animaux.

16266 Avec 70 millions de personnes touchées dans le monde, et un nouveau cas pour 2 000 habitants par an dans les pays développés, l'épilepsie constitue le syndrome neurologique le plus répandu dans le monde. En France, l'épilepsie affecte 600 000 personnes environ, et plus de la moitié des nouveaux cas sont des jeunes de moins de 20 ans. Alors que près de 30 médicaments anti-épileptiques sont actuellement sur le marché, plus de 1 patient sur 3 continue de faire des crises malgré la prise de ces traitements, qui dans la majorité des cas, ont pour effet secondaire d'aggraver les troubles neuropsychologiques. Il est donc primordial de développer de nouveaux traitements anti-épileptiques visant non seulement à réduire la sévérité ou le nombre des crises, mais aussi à mieux protéger les capacités d'apprentissage et la mémoire. Ce projet s'inscrit donc dans le cadre d'une recherche translationnelle, et vise à explorer dans des modèles établis chez le rat et la souris les bienfaits d'un nouveau candidat médicament, sélectionné à la suite d'études réalisées sur des cultures de cellules cérébrales, qui ont montré qu'une fois appliqué à ces cellules, il inhibe fortement l'un des mécanismes essentiels au développement de la maladie.

L'épilepsie sera induite selon plusieurs modèles complémentaires (pharmacologique ou électrique, chez l'adulte ou le jeune), qui, du point de vue clinique, permettent de couvrir la diversité des cas observés chez les patients atteints d'épilepsie. Trois modèles seront donc utilisés :

- le modèle pilocarpine chez le rat : dans ce cas, l'épilepsie est déclenchée pharmacologiquement. Dans la phase initiale du modèle, l'animal va développer un état de mal épileptique, qui va entraîner un degré de souffrance transitoire de gravité sévère, avec réduction du transit intestinal et perte de poids. Pendant cette phase, l'animal est massé, et les aliments lui sont présentés à la main. A l'issue de cette phase (6 jours), l'animal recouvre un comportement normal, s'alimente et les crises apparaissent après 2 à 4 semaines. A partir de ce moment, le degré de gravité est modéré.

- le modèle du kindling chez le rat : Dans ce cas, des crises sont déclenchées par stimulation directe d'une région du cerveau. Le degré de gravité est modéré, en raison de la chirurgie nécessaire, et du nombre d'injections du candidat médicament qui seront réalisées (quotidiennement pendant 2 mois).

- le modèle du PTZ (pentylènetétrazole) chez la souris : Dans ce cas, un agent convulsivant est administré aux souris 45 min après l'administration du candidat médicament testé. Le degré de gravité est sévère, car, sans protection par la molécule testée, le PTZ entraîne la mort de la souris dans les 30 min qui suivent son administration.

Les effets « anti-crisés » seront évalués par une approche électrophysiologique (enregistrements électroencéphalographiques), associée à une observation comportementale (vidéos) permettant d'estimer la fréquence et la sévérité des crises. Les effets protecteurs de la cognition seront évalués par des explorations électrophysiologiques *ex vivo* et par des tests comportementaux visant à évaluer les niveaux d'anxiété, l'apprentissage spatial et la mémoire. Les effets anti-inflammatoires et les propriétés pharmacocinétiques de ce candidat médicament seront quantifiés post-mortem. A l'issue de chacune des procédures, les animaux seront mis à mort par injection d'une dose létale d'un agent sédatif.

Dans sa conception, le projet a pris en compte la règle éthique des 3R :

Remplacement : Compte tenu du fait que les épilepsies regroupent une diversité de syndromes, il existe à ce jour très peu d'alternatives permettant d'évaluer les différents aspects de la pathologie sur des modèles *in vitro* ou *ex vivo*. Toutefois, en amont des tests *in vivo*, des études *in vitro* ont été réalisées pour sélectionner le candidat médicament pour ses propriétés anti-inflammatoires. Elles devront toutefois être vérifiées *in vivo*. De plus, l'analyse de comportements complexes, comme ceux de l'anxiété et de l'apprentissage spatial, et de surcroît la manifestation de crises épileptiques ne peut être appréhendées au niveau préclinique autrement qu'*in vivo* chez des vertébrés, et ne peut aujourd'hui être remplacée par des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico*.

Réduction : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 1127 animaux (627 rats et 500 souris) sur une durée de 5 ans. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum tout en ne compromettant pas l'atteinte des objectifs de l'étude. Il a été déterminé à l'aide d'outils statistiques, en tenant compte des résultats d'études antérieures dans le laboratoire sur ces mêmes modèles.

Raffinement : Les animaux mâles arriveront suffisamment tôt pour permettre une semaine d'acclimatation avant le début des procédures. Leur poids sera suivi hebdomadairement, et les animaux seront soumis à une surveillance attentive à l'aide d'une grille d'évaluation du bien-être, pour limiter au maximum stress et douleur, et apporter des soins adaptés, le cas échéant. Les animaux qui auront été isolés pour leur confort seront manipulés quotidiennement pendant 5 minutes. Au moment des chirurgies, les conditions d'asepsie seront maintenues durant toute l'anesthésie générale. Un traitement analgésique sera appliqué pour prévenir une quelconque douleur post-opératoire et la température corporelle des animaux sera régulée jusqu'à leur réveil. Enfin, nous nous efforcerons à chaque instant de raffiner nos procédures afin d'optimiser le bien-être des animaux.

16267 La vision est une entrée sensorielle majeure pour guider nos actions et notre perception. Cependant, comprendre le traitement neuronal sous-tendant ces fonctions reste un défi majeur. Imaginons, par exemple, de devoir suivre du regard un objet en mouvement qui passe derrière un objet plus large, le tout dans un environnement pluvieux. Une telle tâche, apparemment réalisée sans difficulté, nécessite une ségrégation des divers signaux de mouvement. Pour résoudre ce problème, notre système visuel doit combiner les signaux sensoriels avec des connaissances a priori, et ce, à plusieurs échelles spatiales et temporelles. Depuis 50 ans, les neurosciences en vision ont accumulé un grand nombre de connaissances mais principalement sur la base d'étude de neurones individuels à une échelle restreinte. Or il apparaît clair que les traitements opérés par le système visuel sont distribués et en interaction constante au sein d'une même aire et entre plusieurs aires corticales.

L'un des objectifs du projet de recherche présenté dans cette saisine est de mieux comprendre les interactions entre les neurones qui relèvent ces défis à l'échelle microscopique, c'est à dire du neurone, ainsi que mésoscopique (entre le microscopique, et le macroscopique, c'est à dire le cerveau en entier). Pour ce faire, nous utilisons le modèle marmouset. Sur ce modèle, nous enregistrons l'activité de neurones dans différentes aires du cortex visuel en essayant de maximiser : la résolution spatiale et/ou temporelle, ainsi que la taille de la surface corticale étudiée. La maximisation simultanée de tous ces paramètres étant par le passé méthodologiquement impossible, nous utiliserons une combinaison de

plusieurs techniques : l'imagerie optique à champ large, l'électrophysiologie et la microscopie multi-photons. Chacune de ces techniques est optimale du point de vue d'un ou plusieurs des paramètres mentionnés, et le choix spécifique de leur utilisation se fera selon les besoins de la question scientifique à laquelle nous voulons répondre.

En parallèle, nous étudierons l'impact de rétines artificielles sur l'activité du cortex visuel pour mieux comprendre les limites et les futurs développements possibles en réhabilitation fonctionnelle. L'accès à ces données va nous offrir l'opportunité de mieux comprendre comment l'information visuelle est intégrée, représentée au niveau du cortex et modulée pour sous-tendre la construction des percepts visuels.

Dans un souci de réduction, les animaux utilisés dans ce projet pourront également aider à un développement méthodologique dont l'objectif est de comprendre les influences respectives de deux aires corticales (le champ oculomoteur frontal (FEF pour Frontal Eye Field) et l'aire latérale intrapariétale (LIP pour Lateral Intraparietal) impliquées dans les comportements d'orientation oculomoteurs. Enfin et en ce qui concerne les protocoles terminaux, nous envisageons de perfuser les animaux de telle sorte que les organes prélevés puissent être analysés par certaines techniques *in vitro* (patch-clamp, culture cellulaire, immuno histo/cyto chimie, etc...)

Pour ce projet nous utiliserons un nombre total maximum de 42 marmousets : 12 animaux pour l'imagerie bi-photonique, 15 animaux pour l'imagerie optique à champ large et 15 animaux pour les études d'électrophysiologie.

- Bénéfice potentiel pour la société et dommages escomptés –

En premier lieu, la réalisation de ce projet va nous permettre d'accroître nos connaissances fondamentales et ainsi de mieux comprendre la manière dont le cerveau intègre et représente l'information visuelle et le rôle joué par certaines régions spécifiques dans les comportements d'orientation oculomoteurs.

Par ailleurs, les informations collectées pourraient permettre d'améliorer les solutions mises en place chez les patients. Elles pourront par exemple contribuer à améliorer les techniques d'appareillage prothétique (électrodes organiques flexibles, dispositifs *ex-situ*) et la performance en réhabilitation visuelle.

Toutes les mesures seront prises pour réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux impliqués dans ce projet. Les procédures les plus invasives seront réalisées sans réveil des animaux.

Règle des 3Rs

Remplacer : Les processus étudiés nécessitent de prendre en compte les interactions au niveau d'un organisme entier et ne sont pas réalisables chez l'Homme. Le choix d'utiliser des PNH est dicté par la thématique de notre projet. En effet, aucune autre espèce n'a un système visuel suffisamment proche de l'humain, notamment avec une hiérarchie des aires corticales identique, une vision diurne, et une sensibilité psychophysique identique. Afin de minimiser le recours aux animaux, nous travaillons sur l'amélioration des techniques d'enregistrement ainsi que sur les méthodes computationnelles permettant de perfectionner le traitement des données et d'extraire le maximum d'information pour chaque animal utilisé.

Réduire : Dans ce projet, nous développerons en parallèle différentes approches pour optimiser la collecte de données par rapport au nombre d'animaux utilisés. Ce nombre est réduit au minimum accepté par la communauté scientifique comme étant nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Il est à noter également que les méthodes d'imagerie photonique peu invasives permettent de collecter un grand nombre de données sur le long terme sur un même animal. Enfin, pour optimiser l'utilisation de chaque animal, si l'état général de celui-ci le permet, chaque procédure pourra être réalisée sur les deux hémisphères et/ou les deux yeux.

Raffiner : Dans l'ensemble de ces approches, une anesthésie, une analgésie, ainsi qu'un suivi et des soins post-opératoires appropriés seront mis en place afin de limiter au mieux la souffrance ou la douleur des animaux.

16268 Dans une démarche de raffinement des expérimentations, nous souhaitons consacrer des animaux à la formation du personnel aux divers gestes techniques que nous pratiquons en routine. La thématique du laboratoire est notamment axée vers la recherche thérapeutique dans la lutte contre le cancer. Nos recherches, une fois les essais préliminaires *in vitro* validés, nous mènent le plus souvent à des essais *in vivo*, les études sur cellules ne pouvant pas se substituer aux études sur un organisme entier afin d'évaluer les effets potentiellement indésirables d'une thérapie ou d'une molécule diagnostique sur l'ensemble d'un organisme. Dans un objectif de raffinement des diverses méthodes mais également de réduction du nombre d'animaux utilisés pour une étude donnée, nous souhaitons travailler de manière continue sur un petit nombre d'animaux à la formation du personnel sur les divers modes d'administration (injections intraveineuses, intrapéritonéales, sous cutanée, gavages) de molécules et de prélèvements sanguins auxquels nous sommes amenés lors des diverses études. En effet, nous avons régulièrement du nouveau personnel (étudiants, temporaires ou statutaires) et nous mettons également en place mais de manière plus anecdotique de nouvelles approches techniques ce qui nous oblige à former l'ensemble des acteurs des différents projets aux nouvelles approches dans le but d'être plus affinés dans nos études. Ces formations s'effectueront en continu par des personnes maîtrisant lesdites techniques. La surveillance quotidienne des animaux permettra de détecter 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 (rougeur persistante au niveau du point d'injection/prélèvement, perte de poids, apathie...). 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).

Nous travaillons principalement sur 3 modèles de souris ayant notamment une pigmentation différente ce qui joue un grand rôle dans l'appréhension des gestes d'injections intraveineuses plus particulièrement. Au regard de ce constat, l'utilisation de 20 souris par souche deux fois par an (600 souris sur 5 ans + 22 souris euthanasiées le 16/03/20 suite à la crise sanitaire COVID-19) serait nécessaire à la formation du personnel. Concernant le rat sur lequel nous travaillons, l'utilisation de 6 animaux 2 fois par an serait nécessaire (60 rats sur 5 ans). Il s'agit d'un nombre maximum d'animaux qui pourra être revu à la baisse en fonction des besoins de formation.

16269 FINALITE : Ce projet de recherche de type translationnelle d'une durée de 5 années a pour but de mettre en place un modèle d'infection du macaque cynomolgus par la souche Soudan du virus Ebola. Ce modèle va permettre de caractériser précisément les signes et les manifestations cliniques de cette souche et de développer un modèle d'infection permettant l'évaluation de contre-mesures au virus Ebola. Ce projet va permettre d'obtenir des données précises sur ce modèle en vue de tester ultérieurement des outils thérapeutiques humains qui ont été développés aux Etats Unis pour lutter spécifiquement contre cette souche Soudan.

OBJECTIF ET BENEFICES ESCOMPTES : Les maladies infectieuses restent une des causes majeures de décès dans le monde et les maladies émergentes ou ré émergentes hautement infectieuses peuvent avoir un impact socio-économique très important dans les pays en voie de développement ainsi qu'en Europe.

Dans ce contexte, les infections à virus Ebola (EBOV) et à virus de Marburg (MARV) provoquent une fièvre hémorragique virale (VHF) avec des taux de létalité allant jusqu'à 90% chez l'homme, la mort se produisant souvent dans les 7 à 10 jours suivant l'infection. Le virus Ebola provoque une fièvre hémorragique sévère pour laquelle il n'existe actuellement aucun vaccin ou traitement efficace.

Depuis sa découverte en 1976, le virus Ebola a ainsi été responsable de plus d'une vingtaine d'épidémies en Afrique Centrale, dans des villages isolés, à proximité des forêts. L'épidémie à virus Ebola sans précédent qui a touché l'Afrique de l'Ouest entre 2014 et 2016 a clairement mis en évidence la possibilité pour ce virus d'émerger dans des contrées jusque-là épargnées et les conséquences dramatiques d'une telle épidémie en zones urbanisées. L'enjeu des recherches actuelles est donc de mettre au point des outils thérapeutiques et prophylactiques pour lutter contre la maladie à virus Ebola, et ce pour l'ensemble des espèces du virus responsables d'épidémies mortelles.

Dans ce contexte, le modèle primates non humains (PNH) est un outil majeur pour l'étude des fièvres hémorragiques virales telles que la maladie à virus Ebola, en particulier pour tester les candidats vaccins et les traitements antiviraux.

Alors que les modèles d'infection chez le macaque cynomolgus par le virus Ebola pour les souches Zaïre et Makona ont été étudiés et caractérisés, ce modèle d'infection n'a pas encore été mis en place pour la souche Soudan.

Le but de ce projet est ainsi de caractériser pleinement le modèle d'infection EBOV Soudan chez le macaque cynomolgus afin d'être en capacité d'utiliser ce modèle bien contrôlé dans le cadre d'étude d'efficacité de moyens de lutte contre le virus Ebola, avec des études de pharmacocinétiques qui pourront alors être utilisées pour soutenir l'homologation d'un produit et pouvoir rapidement le proposer à la population.

NUISANCES PREVUES : Pour ce projet, une expérimentation d'une procédure classée sévère sur 12 animaux est nécessaire. Les 12 animaux seront infectés par voie intramusculaire par la souche Soudan avec la dose classiquement étudiée dans les modèles d'inoculation par Ebola. Les animaux seront quotidiennement suivis et tous les symptômes seront caractérisés et chiffrés grâce à une table de scoring éprouvée. Les animaux seront pesés et prélevés en sang régulièrement. Un système de télémétrie sera implanté en amont afin de pouvoir suivre en temps réelle l'activité et la température corporelle des animaux (paramètre critique dans le suivi de la pathologie des animaux infectés par Ebola). Ce système de télémétrie et un système de vidéosurveillance permettra de suivre le comportement des animaux pendant les périodes où ils ne seront pas stimulés par la présence des techniciens. Les animaux seront suivis pendant 19 jours après infection par le virus Ebola. Les animaux infectés devraient présenter des signes cliniques tels qu'une dérégulation de la température corporelle, une perte de poids, une baisse de l'alimentation, de l'hydratation et du tonus ainsi que des symptômes hémorragiques. Les animaux atteignant le point limite au niveau du score clinique ou parvenus au terme de l'expérimentation seront anesthésiés puis euthanasiés afin de procéder à une autopsie avec collecte d'échantillons.

APPLICATION DE LA REGLE DES 3R :

Le nombre d'animaux a été fixé à 12 pour une procédure. Ce nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables et robustes tout en restant en accord avec les capacités d'hébergement de l'animalerie. Le macaque, contrairement aux rongeurs pour lesquels seules des souches adaptées spécifiquement à l'espèce induisent des signes cliniques et le développement de la maladie, est un modèle animal sensible à l'infection par la souche sauvage du virus Ebola. Il est par ailleurs le seul modèle animal pertinent pour lequel la pathogenèse et les réponses immunitaires induites par le virus Ebola sont très proches de ceux observés chez l'homme et qui permet la meilleure extrapolation possible des résultats. Par conséquent, ce modèle répond à la pertinence scientifique la plus élevée pour atteindre l'objectif de ce projet. De plus, notre expérience acquise jusqu'à lors sur ce modèle permet d'optimiser au maximum les observations et les données collectées.

Une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, l'enrichissement de confort et sur l'enrichissement de stimulation (balles, altères, anneaux, sachets surprises, friandises enfouies...). Le suivi sera quotidien et les animaux seront observés par un personnel avisé et qualifié. Un examen clinique sera effectué à chaque anesthésie. Un système de télémétrie sera implanté en amont afin de pouvoir suivre en temps réelle l'activité et la température corporelle des animaux (paramètre critique dans le suivi de la pathologie des animaux infectés par Ebola). Un système de vidéosurveillance permettra également de voir le comportement des animaux pendant les périodes où ils ne seront pas stimulés par la présence des techniciens. Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'un scoring éprouvé qui reprend les observations du comportement et des symptômes hémorragiques.

16270 L'attention est une fonction cognitive majeure et les déficits attentionnels se retrouvent dans plusieurs maladies psychiatriques. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux processus attentionnels dans des conditions non pathologiques constitue une étape indispensable pour guider la mise en œuvre d'outils thérapeutiques pour le traitement des déficits attentionnels.

Ce projet de recherche fondamentale d'une durée de 4 ans a pour objectif de tester les bases comportementales et les mécanismes neuronaux impliqués dans l'attention aux odeurs. Le but général est de déterminer si ces mécanismes sont similaires à ceux retrouvés dans les autres modalités sensorielles. Ce projet sera réalisé chez le rat et nous aurons besoin de 115 animaux pour répondre à nos questions. Ce projet va reposer sur une approche combinant comportement, optogénétique et électrophysiologie chez le rat.

Dans ce projet, nous proposons d'utiliser la modalité olfactive, un sens dominant pour les rongeurs, donc une modalité appropriée et écologique pour étudier l'attention chez le rat. Notre projet vise à :

1) tester si l'attention aux odeurs fluctue chez le rat en combinant tout d'abord une tâche d'attention aux odeurs dans un pléthysmographe (enregistrement non invasif de la respiration) et ensuite en combinant une tâche d'attention à l'optogénétique pour disséquer les fondements des performances attentionnelles.

2) déterminer le réseau cérébral sous-tendant l'attention aux odeurs en combinant tâche comportementale et électrophysiologie.

Deux des procédures sont légères (études comportementales) et dans ce cas, les animaux pourront être réutilisés dans un autre projet ou proposés au placement. Les deux autres procédures, de classe modérée, nécessitent une chirurgie (optogénétique et électrophysiologie). Tous les actes de chirurgie seront réalisés sous anesthésie et analgésie. Post-chirurgie, les rats recevront des antalgiques et seront étroitement surveillés. L'expérience sera stoppée si les points limites sont atteints. Pour ces deux procédures de classe modérée, les animaux seront mis à mort à la fin de l'expérience pour pouvoir réaliser des vérifications histologiques sur leur cerveau.

Engagement vis à vis des exigences des 3 R :

Remplacement : L'enregistrement simultané de multiples aires cérébrales et l'utilisation de l'optogénétique rendent ces expériences non envisageables chez le sujet humain. L'étude des rythmes cérébraux et respiratoire couplée à une tâche d'attention nécessite l'utilisation d'animaux vivants et ne peut s'envisager sur des modèles *in vitro*.

Réduction du nombre d'animaux : Pour mener ce projet, nous aurons besoin d'utiliser 115 rats pendant la durée du projet. 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. Le modèle du rat est particulièrement approprié pour ce projet car :

-Nous souhaitons enregistrer plusieurs aires cérébrales, le cerveau du rat est assez large pour pouvoir faire des enregistrements multi-sites simultanés.

-Nous allons moduler de façon sélective l'activité de certaines zones du cerveau grâce à l'optogénétique pour disséquer les mécanismes de l'attention aux odeurs.

-Les rats ont des capacités cognitives très bonnes et peuvent donc réaliser des tâches comportementales complexes similaires à celles utilisées chez l'Homme.

Le bien-être des animaux et en particulier des rats dans ce projet est un point critique non seulement pour les animaux eux-mêmes mais également pour la reproductibilité et la validité des expériences. Pour se faire, la santé des animaux sera continuellement évaluée selon une grille de scores définis.

Mots clés : attention, olfaction, respiration, rat, rythmes cérébraux

16271 Dans le contexte de la Maladie de Huntington (MH), il existe une grande variabilité dans l'âge d'apparition et la sévérité des symptômes, ce qui laisse supposer une influence du contexte environnemental. Parmi les facteurs environnementaux pouvant intervenir se trouvent les facteurs nutritionnels, tels que les vitamines du groupe B. Une déficience nutritionnelle ou génétique en vitamines engendre une accumulation de l'homocystéine, un acide aminé pro-oxydant et neurotoxique. Une carence en vitamines B9 et B12 et l'augmentation de l'homocystéine qui en résulte augmentent le risque d'apparition de pathologies neurodégénératives. Nous avons très récemment démontré ce processus dans la Maladie d'Alzheimer élucidant ainsi le lien entre carences en vitamines B et Maladie d'Alzheimer.

Les patients atteints de la maladie de Huntington (MH) présentent souvent une augmentation des taux sanguins en homocystéine. Il a également été montré que les patients Huntington porteurs de la mutation de la protéine huntingtine et d'une modification des apports en vitamines B présentent une apparition de la MH beaucoup plus précoce. Nous avons récemment mis en évidence, *in vitro*, que l'homocystéine influençait négativement la fonction de la protéine huntingtine. Nous formulons l'hypothèse que l'accumulation de forme homocystéine de la huntingtine au cours de la vie est un facteur de risque aggravant dans la maladie de Huntington en termes de précocité et de sévérité des symptômes. Pour explorer cette hypothèse l'objectif de ce projet se décline en deux parties : (1) analyser les conséquences de l'augmentation des taux d'homocystéine sur la huntingtine normale et mutée et élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués. (2) élucider si les déficits en vitamines B et l'augmentation de l'homocystéine associée, sont des facteurs aggravants de la maladie et ce en vue de développer de nouveaux biomarqueurs.

Nous souhaitons maintenant donc mener une étude *in vivo* sur un modèle de souris dite Huntington qui présentent une protéine huntingtine mutée proche de ce qu'on rencontre chez les humains.

Les symptômes de la maladie de Huntington sont de l'ordre des manifestations comportementales avec des troubles fonctionnels touchant la coordination des mouvements, la motricité, la cognition, aussi les tests proposés dans les procédures entrent dans ce cadre thématique de la caractérisation fonctionnelle de notre modèle.

Les différents tests comportementaux sont prévus tout au long de la vie des souris (protocoles prévus jusqu'à 18 mois d'âge des souris, sauf si apparition des symptômes majeurs avant cet âge), afin de réaliser un criblage le plus complet possible.

Cependant pour respecter le bien-être des animaux, tous ne subiront pas l'ensemble des tests prévus; ainsi à partir des différents lots d'animaux constitués, les souris se verront attribuer des tests espacés dans le temps, en fonction de leur âge. Malgré tout, certains tests sont complémentaires entre eux et ne peuvent être trop espacés ou séparés entre différents lots. Enfin, la plupart des tests choisis dans cette étude ont été développés et caractérisés selon le mouvement "behaviouriste" des neurosciences des années 1970-80 et qui prône la quantification de paramètres caractéristiques des comportements par l'observation simple de l'individu placé dans une situation type, d'où pas ou peu d'intervention de l'expérimentateur portant potentiellement atteinte à l'intégrité de l'animal (3R: raffinement).

Le croisement des géniteurs pour obtenir le génotype des souriceaux adéquat pour ce projet permet d'obtenir 3 groupes génotypiques différents dont l'hypothèse globale serait de montrer des symptômes Htt d'intensité croissante sur ces 3 groupes génotypiques. De plus nous devons prendre la précaution de stratifier selon le sexe des individus et donc considérer des groupes mâles et femelles séparément. La carence alimentaire en vitamines B9 et B12 se fera donc sur l'ensemble de ces précédents groupes définis. D'où 12 groupes de 10 animaux chacun; ce qui porte le nombre total d'animaux à 120 pour ce projet.

Cependant un nombre important de tests comportementaux sont nécessaires pour effectuer un criblage le plus précis possible par rapport (1) à la pathologie humaine et (2) la découverte de paramètres (comportementaux) marqueurs utilisables ensuite dans un protocole de traitement. Ainsi, par rapport au nombre de ces tests, nous proposons de créer 3 groupes de tests pour que tous les animaux ne passent pas tous les tests et qu'il y ait des "pauses" comportementales, surtout dans les premières semaines de vie. Dans ce cas, le nombre total d'animaux répartis entre ces différents groupes serait de : Douze groupes d'animaux seront mis en place (3 génotypes x 2 sexes x 2 types d'alimentation) X 10 animaux chacun (pour assurer la pertinence statistique) X 3 groupes des tests comportementaux pour que tous les animaux ne passent pas tous les tests, soit un total de 360 animaux.

L'expérience montre que malheureusement certains des tests proposés engendrent des animaux dits "non-répondeurs" qui ne veulent pas réaliser le test pour des raisons inconnues. Or comme tous les tests sont non-interventionnistes, il n'est pas prévu de forcer les animaux à les réaliser. Dans ce cas il est recommandé de prévoir plus de 10 animaux par groupe (12 à 15), ce que nous ne choisissons pas car (1) nous souhaitons réduire au maximum le nombre d'animaux (3R: réduction) et que (2) tous les tests seront soit réalisés, soit supervisés par un neurocomportementaliste expérimenté.

Chacun des groupes ci-dessous déterminé sera donc composé de 120 animaux.

Groupes comportementaux:

G1=tests de coordination des mouvements, locomotion et force musculaire

G2=tests d'apprentissage, de mémorisation et tests psychologiques

G3=tests d'exploration, de niveau d'anxiété et interaction sociale

16272 Introduction : La peau est le plus grand organe du corps et remplit de nombreuses fonctions. Au cours du vieillissement, la qualité de la peau diminue ce qui se traduit par une perte de l'élasticité et de la tonicité du derme, une perte de volume (affaissement de la peau), une moindre hydratation et une diminution de son épaisseur. Ces changements morphologiques résultent d'une diminution de la quantité et de la qualité des fibres de collagène, d'élastine et de la production de radicaux libres. Le vieillissement cutané se produit dans les différentes couches de la peau : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

Au niveau de la peau, l'acide hyaluronique (HA) est présent de manière tout à fait naturelle et est surtout retrouvé au niveau du derme et en moindre quantité au niveau de l'épiderme. Avec le temps son taux diminue progressivement. Il est essentiel au maintien de la structure des couches de la peau, il nourrit et hydrate le collagène et plus récemment des données scientifiques lui attribuent des propriétés sur la fermeté de la peau via une stimulation des cellules souches adipocytaires impliquées dans la régénération cutanée.

Les formulations d'HA sont utilisées couramment depuis de nombreuses années en médecine corrective. Elles sont considérées comme des dispositifs médicaux, puisqu'elles sont introduites de manière invasive dans la peau, à l'aide d'une seringue, et sont destinées à demeurer en place pendant une période d'au moins trente jours. De ce fait la réglementation européenne et US impose de démontrer la sécurité sanitaire et les bénéfices de ces dispositifs tout en préservant l'innovation.

Objectif du projet: Dans ce projet, on se propose, d'évaluer le bénéfice de formulations innovantes d'HA sur la régénération tissulaire de la peau et de son tissu adipeux chez le rongeurs (souris et rat). Différentes voies d'administration peuvent être abordées (sous-cutanée (SC), intradermique (ID), intra musculaire (IM)) afin d'induire une activation du tissu cible (hypoderme, derme, épiderme, tissus adipeux, muscle). Des injections uniques ou répétées peuvent être réalisées. Le suivi de la régénération tissulaire sera réalisé par une analyse de l'expression de biomarqueurs impliqués dans ce processus, comme la production de collagène ou d'élastine et une observation histologique de la peau. Ce projet sera réalisé dans un modèle sain. Les résultats obtenus permettront de définir si une injection unique ou répétée de ces dispositifs médicaux innovants induit un bénéfice au niveau de la régénération tissulaire de la peau, plus particulièrement au niveau du derme qui se traduirait par un effet prolongé en clinique.

Avantages escomptés: Ce projet permettra de documenter la mise en place d'un processus de réparation tissulaire conduisant à une redensification/réjuvenation du derme.

Domages escomptés: Les formulations d'HA sont utilisées depuis de nombreuses années en médecine corrective et sont bien tolérées chez l'Homme. Cependant et afin d'anticiper des dommages éventuels liés à l'injection de ces formulations, des points limites précis ont été établis et serviront à garantir le bien être optimal de l'animal.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour documenter le bénéfice des ces dispositifs médicaux après une injection unique ou répétée en SC, ID, IM ou dans le coussin adipeux mammaire.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

Choix des espèces / Méthode de raffinement :

Les espèces souris et rats sont largement décrites dans la littérature pour documenter les bénéfices de ces dispositifs médicaux. Ils permettent une injection dans le derme profond ou en intra musculaire en multipliant les sites d'injection par animal.

En préambule de l'étude (Procédure 2), une étude de faisabilité (Procédure 1) permettant de déterminer le volume d'injection et le nombre de site d'injection adaptés pourra être réalisée selon la nature du dispositif médical (la capacité d'injection est dépendante de la nature du dispositif médical : propriété physico-chimique du HA, et de la localisation de l'injection). Ceci permettra d'ajuster le nombre d'animaux et de contribuer aux raffinements des études.

Nombre d'animaux : Sur une période de 5 ans, 1500 animaux maximum (rats et/ou souris) seront nécessaires à l'évaluation de ces dispositifs médicaux innovants dont 10% seront dédiés à l'étude de faisabilité et à la formation / maintien des compétences aux gestes techniques.

Conditions d'hébergement et de soins: Les conditions d'hébergement et de soins utilisées ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations françaises et européennes. Les animaux sont hébergés en cage collective. Le milieu environnemental pourra être amélioré, par un enrichissement adapté pour leur permettre de s'occuper et d'exprimer des comportements spécifiques de l'espèce, par exemple, des blocs à ronger et des tunnels.

Avant chaque étude, une période d'acclimatation, d'au moins 5 jours, sera appliquée; Période durant laquelle les animaux seront visités chaque jour, afin qu'ils s'habituent à la présence humaine.

Afin de s'assurer du bien-être animal sur la durée de l'expérimentation, des points limites ont été définis. 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, en appliquant des protocoles analgésiques pré établis.

16273 L'objectif du projet est d'évaluer l'effet de différents principes actifs sur la prolifération tumorale chez le rat ou la souris immunocompétent(e) ou immunodéficient(e). Les cancers sont des pathologies particulièrement invalidantes dont les traitements ont de lourds effets secondaires et nécessitent d'être constamment améliorés.

Les modèles de cancer réalisés chez le rongeur par xénogreffe ou allogreffe de cellules humaines ou de rongeurs offrent des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique. L'injection de lignées cellulaires tumorales chez le rongeur permet de mimer différents types de cancers grâce au choix de la lignée cellulaire cancéreuse ainsi qu'au site d'injection et donc de tester de nombreux composés inhibant la croissance voire détruisant les tumeurs tout en vérifiant la non-toxicité de ces composés.

Cette saisine sera divisée en trois procédures permettant de modéliser trois types de greffe par injection de cellules tumorales chez le rongeur. Ces trois procédures permettent de réaliser respectivement :

1) les premiers tests d'efficacité d'une molécule en cours de développement sur un modèle animal simple (injection sous-cutanée de cellules tumorales)

2) des tests d'efficacité dans un modèle animal plus complexe mais plus 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 (injection dans un organe cible de cellules tumorales issues de cet organe cible)

3) des tests d'efficacité dans un modèle d'invasion tumorale qui permet de modéliser les tumeurs secondaires ou métastases (injection systémique de cellules tumorales)

Notre société est une CRO (Clinical Research Organization– organisme de recherche sous contrat) qui mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique. La présente saisine est donc une saisine générique (vu avec la DSV, le CEEA et le MESR pour la soumission de saisines génériques) qui a pour but d'évaluer de nouveaux composés créés et développés par nos clients pouvant cibler un maximum de pathologies cancéreuses.

Les différents composés, en comparaison à un produit de référence adapté si existant, seront étudiés dans les modèles de greffe par injection de cellules tumorales chez le rongeur décrits dans les trois procédures. Les composés seront testés chez la souris et/ou le rat (selon le modèle), en traitement préventif ou curatif, 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 (4 études souris et 1 étude rat), soit 25 études (20 études souris et 5 études rat) sur 5 ans.

Sachant que 40 à 120 animaux sont utilisés par étude, nous estimons que 2400 souris et 600 rats seront utilisés au maximum sur 5 ans.

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.

Réduire : pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. D'autre part, 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.

Raffiner : 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 de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu. Les injections de cellules et les traitements analgésiques seront réalisés par des expérimentateurs formés ce qui permet de réduire le traumatisme et le stress induit. Outre la gestion de l'analgésie, l'état général et clinique des animaux sera surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un porteur du projet pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière sera plus spécifiquement axée sur les douleurs occasionnées par la prolifération tumorale, les effets secondaires des traitements s'ils sont connus et sur le poids de l'animal (indice majeur de stress et de souffrance). L'évaluation journalière permettra la mise en place et l'ajustement de traitements analgésiques. Tout animal ayant atteint un ou plusieurs des points limites (repéré le plus précocement possible grâce à un suivi quotidien) sera euthanasié.

16274 L'évolution a façonné divers mécanismes qui permettent aux organismes de détecter des perturbations environnementales et dangers éventuels. Le système nerveux et le système immunitaire ont en commun cette capacité de rapidement percevoir, intégrer et répondre à des changements de l'environnement pour adopter un comportement adapté à la situation et maintenir l'intégrité de l'organisme. L'intestin, notamment du fait du nombre conséquent de cellules immunitaires ainsi que de la présence du microbiote, est considéré comme le premier organe immunitaire de l'organisme vertébré. C'est également un organe richement peuplé de cellules nerveuses qui composent le système nerveux entérique et qui est la cible de nombreuses innervations extrinsèques en provenance du cerveau (nerf vague) et de la moelle épinière (nerfs spinaux). L'ensemble de ces éléments font de l'intestin un organe de choix pour l'étude des interactions entre système nerveux, système immunitaire et microbiote, aussi appelé axe microbiote/intestin/cerveau. Un nombre grandissant d'études soulignent l'importance de la communication neuro-immune dans l'intestin — via des neurotransmetteurs et des cytokines — ainsi que la capacité du microbiote à moduler l'activité du système nerveux et du système immunitaire. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires à la base de l'intégration de ces interactions inter-systèmes restent à élucider. Ce projet cherche donc à préciser la nature moléculaire et cellulaire, la diversité, la plasticité et le rôle fonctionnel des voies de communication entre système nerveux, système immunitaire et microbiote intestinal. Ces résultats obtenus dans un contexte physiologique seront ensuite étendus dans un contexte de challenge de l'intestin.

Pour caractériser le rôle fonctionnel de cet axe de communication microbiote-intestin-cerveau, plusieurs approches de mesure et de manipulation des systèmes seront réalisées, s'appuyant sur différentes méthodologies (génétique, pharmacologique, optogénétique, électrophysiologique) chez la souris, via des mesures ponctuelles ou chroniques, associant dans les cinq procédures du projet une chirurgie sous anesthésie et analgésie. Dans ce projet, le niveau de sévérité sera de niveau modéré.

Le nombre d'animaux a été optimisé du point de vue statistique pour équilibrer d'une part la variabilité estimée de nos mesures et la puissance statistique attendue et d'autre part les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. En particulier, pour réduire le nombre final d'individus,

des efforts techniques sont mis en place pour multiplier les nombres de mesures par animaux et pour réaliser des mesures chroniques chez l'animal éveillé permettant l'utilisation de chaque animal comme son propre contrôle et ouvrant ainsi la possibilité de tester plusieurs composés chez le même animal.

Le recours à des expériences *in vivo* chez l'animal éveillé est indispensable pour étudier les interactions entre systèmes nerveux, immunitaires et microbien dans leur intégrité fonctionnelle. Cela dit, une partie des expériences seront réalisées *in vitro* pour les aspects plus descriptifs.

Les animaux utilisés seront des souris adultes (8-16 semaines), mâles et femelles, de lignées génétiquement modifiées ou non, sans phénotype dommageable (au total 6708 souris). Pour les expériences qui impliquent une douleur ou une souffrance potentielle, les souris seront surveillées tous les jours et les expériences seront interrompues dès que les points limites spécifiques sont atteints.

16275 CONTEXTE : Le virus Lassa (LASV) a un impact significatif sur la santé et l'économie des pays d'Afrique de l'Ouest, infectant environ 500000 personnes chaque année. LASV est responsable d'environ 6000 morts par an, avec des taux de mortalité atteignant près de 50% chez les jeunes enfants. De plus, 20% des survivants présentent des séquelles, notamment un déficit auditif. Bien qu'étant un problème de santé publique majeur dans les pays endémiques, il n'existe à ce jour aucun vaccin pour prévenir les infections à LASV et aucun traitement complètement efficace. Le développement de vaccin LASV a notamment été ralenti par le manque de connaissance sur ce pathogène de classe 4.

OBJECTIF ET TYPE DE PROJET : Ce projet de recherche translationnelle de 5 ans est composé d'une procédure classée sévère et se concentre sur une meilleure compréhension des infections à arénavirus et sur le développement de contre-mesures. En ce sens, nous avons rationnellement développé des vecteurs recombinants basés sur une souche vaccinale du virus de la rougeole exprimant des antigènes de LASV. Leur innocuité, leur immunogénicité et leur efficacité ont été démontrées chez le singe cynomolgus permettant de sélectionner le meilleur candidat, pour son développement vers des phases cliniques. Le but de ce projet est de tester si ce candidat vaccin, qui a déjà démontré son efficacité lors de précédentes expérimentations, peut induire une immunité protectrice lorsqu'il est administré deux semaines, une semaine ou une heure après l'infection par LASV, tout en respectant la règle des 3R (remplacement, raffinement et réduction).

PROCEDURES, ESPECE ANIMALE ET EFFETS ESCOMPTES

Pour ce projet, un total de 12 singes cynomolgus sera utilisé. Afin d'obtenir des résultats statistiques significatifs et robustes tout en respectant la règle des 3R, les animaux seront répartis en 4 groupes de 3 animaux :

Le groupe 1 sera composé de 3 singes vaccinés 16 jours avant l'infection par LASV;

Le groupe 2 de 3 singes vaccinés 8 jours avant l'infection par LASV;

Le groupe 3 de 3 singes infectés par LASV puis vaccinés une heure après l'infection ;

Le groupe 4 de 3 singes contrôles vaccinés par le vaccin contrôle 16 jours avant l'infection par LASV.

Ce dernier groupe représente le meilleur contrôle pour démontrer que la protection est conférée par la réponse contre les antigènes et non contre le vecteur. De plus, il est nécessaire d'avoir des animaux contrôles ayant subi le même protocole expérimental pour analyser l'efficacité de protection du candidat vaccin.

Les singes seront équipés par le fournisseur d'un système d'implants permettant d'avoir en temps réel le suivi de température et d'activité. Ces mesures seront très utiles pour valider l'efficacité du vaccin (et son innocuité après l'immunisation), puisque la fièvre est le signe clinique le plus évident à objectiver chez le singe infecté par le virus Lassa. Les animaux ne seront pas manipulés vigiles, uniquement sous anesthésie générale lors desquelles les prises de poids, de température et les prélèvements de sang seront réalisés (une attention particulière sera portée lors des prélèvements de sang afin d'éviter la formation d'hématome grâce à de longs points de compression et la pose d'une pommade anti-œdémateuse locale). Un vétérinaire sera d'astreinte pendant la durée de l'expérimentation et interviendra si nécessaire. Une attention sera également portée sur l'enrichissement alimentaire, de confort et de stimulation. Les résultats obtenus précédemment sur ce modèle nous permettent d'anticiper la dégradation de l'état de santé des animaux (expérience du modèle et table de scoring

éprouvée) et de prendre les mesures nécessaires pour réduire l'état de souffrance des animaux dès que le point limite est atteint. Les résultats obtenus précédemment suggèrent que les animaux vaccinés seront protégés contre le virus LASV. Cependant, compte tenu du temps réduit entre la vaccination et l'infection et le temps nécessaire pour la mise en place d'une immunité protectrice, il est attendu que les animaux présentant un laps de temps plus grand entre vaccination et infection devraient présenter moins de signes cliniques que les autres (groupe 1 < groupe 2 < groupe 3). Les contrôles présenteront des effets néfastes sévères, notamment des changements de température corporelle, une perte de poids, une baisse de l'alimentation et de l'hydratation ainsi qu'une baisse de tonus. Les animaux atteignant le point limite au niveau du score clinique ou atteignant le terme de l'expérimentation seront anesthésiés puis euthanasiés afin de procéder à une nécropsie avec collecte d'échantillons.

16276 La douleur est un problème de santé publique très important (10% de la population souffre d'une douleur chronique) autant dans la vie quotidienne que lors d'accidents ou suite à une opération chirurgicale, des traitements avec les médicaments anti-cancer, les effets secondaires de la diabète et d'autres maladies. Le système nerveux est le système physiologique qui permet de ressentir la douleur. Les informations corporelles (toucher, chaleur, froid, douleur, tension musculaire) en provenance de la peau, le muscle et des tissus profonds sont transmises par les neurones somatosensoriels vers notre cerveau. Ces informations sensorielles sont alors intégrées et transmises au cerveau provoquant ainsi nous sensations corporelles. L'organisation anatomiques de ces circuits qui sous-tendant les sensations corporelles s'effectuent au cours des premières semaines (chez la souris) et années (chez l'homme) après la naissance et impliquent des connexions neuronales, qui sont affinées par expérience.

Les stimuli tactiles (toucher) contribuent à la mise en place des circuits de la douleur et les symptômes douloureux de patients souffrant de douleurs chroniques sont la conséquence d'une réorganisation des circuits du toucher et de la douleur. Nous proposons ici d'utiliser des modèles innovants de souris transgéniques permettant de manipuler spécifiquement des neurones du toucher, soit en les éliminant soit en changeant leur activité électrique, et d'en étudier les conséquences sûres : i) la maturation des circuits de la douleur ii) le développement de douleurs chroniques dans des modèles animaux.

Pour ce projet, l'utilisation de souris transgéniques permettant de cibler spécifiquement les neurones du toucher 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, 264 souris seront utilisées dans ce projet (voir description du projet).

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 minimum. 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.

Ce projet porte sur le toucher et la douleur. Par conséquent, l'utilisation des médicaments anti-douleur 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. Les animaux seront observés quotidiennement au cours de l'expérimentation et nous utiliserons une grille d'évaluation de la douleur pour évaluer l'état général et la douleur des animaux. 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.

16277 Le sepsis est l'état associé aux infections sévères chez l'homme et garde une mortalité importante malgré l'utilisation d'antibiotiques. Les causes de cette maladie ne sont pas bien décrites. Ces infections diffèrent selon l'organe infecté et le type de bactérie.

Dans ce projet, nous allons essayer de mieux comprendre l'origine de la mortalité lors du sepsis et de déterminer quel est le facteur principal de la mortalité entre la réponse de l'hôte (Homme) aux bactéries et l'effet direct des bactéries. Pour cela nous utiliserons différents modèles infectieux qui présentent chacun des caractéristiques propres :

1. Un modèle d'infection mono-bactérienne intra-abdominale (péritonite) par injection de bactéries mortes ou vivantes.
2. Un modèle d'injection d'une molécule présente au niveau de la surface bactérienne
3. Un modèle d'infection pulmonaire (une bactérie connue pour induire le sepsis chez l'homme via les poumons). Des résultats de notre laboratoire suggèrent que certaines molécules de l'hôte influencent sur la mortalité lors de sepsis. Pour cela, ces quatre modèles vont être effectués chez des souris qui expriment ou pas des molécules pro-inflammatoires (2 protéines) et anti-inflammatoires (une protéine) en présence ou pas des récepteurs aux anticorps anti-bactéries. Le phénotype de l'ensemble des souris utilisées dans ce projet est non dommageable.

Ce projet se déroulera sur une période de 5 ans.

Ce projet nécessitera un nombre total de 1746 souris.

La conformité avec les exigences de remplacement, réduction et raffinement seront pris en compte :

1) Remplacement, les connaissances issues de cette étude *in vivo* ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la réponse inflammatoire qui nécessite de travailler à l'échelle d'un organisme. En revanche, nous avons établi des lignées cellulaires pour étudier les mécanismes *in vitro*.

2) Réduction, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables à 6 par sous-groupe ; les expériences qui ont le même groupe contrôle sont effectuées en simultanément pour limiter le nombre des souris contrôles.

3) Raffinement, les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal et l'utilisation d'antalgiques sera systématique si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les animaux seront évalués à l'aide de points limites bien définis, entraînant l'arrêt anticipé de l'expérimentation si nécessaire.

A terme, ce projet pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques permettant de mieux prendre en charge le sepsis chez l'homme.

16278 L'hémophilie A est une maladie génétique rare liée au chromosome X et caractérisée par un déficit en Facteur VIII (FVIII) de la coagulation. Afin de corriger le saignement, du FVIII dit 'thérapeutique' est administré par voie intraveineuse aux patients. Malheureusement, chez 30% des patients, une réponse immunitaire dirigée contre le FVIII est observée. Chez ces patients, le développement d'anticorps anti-FVIII ayant la capacité d'inhiber l'activité pro-coagulante du FVIII mène à une impasse thérapeutique. L'apparition de ces anticorps résulte de la mise en place d'une réponse du système immunitaire dirigée contre le FVIII exogène.

Différents facteurs de risques génétiques et environnementaux ont été associés à l'apparition des inhibiteurs du FVIII. Parmi ces facteurs de risques, le statut inflammatoire du patient au moment du traitement avec le FVIII est régulièrement évoqué. Dans ce contexte, le fait que les patients hémophiles A du Sud de la France (Marseille, Toulouse, Montpellier, Lyon) développent moins fréquemment des inhibiteurs du FVIII que les patients du nord de la France (Lilles, Paris, Caen), pose la question d'une influence de l'exposition au soleil et des taux de vitamine D sur le développement d'une réponse immunitaire au FVIII.

En effet, plusieurs études récentes indiquent que la vitamine D exerce des fonctions de régulation sur le système immunitaire. Aussi, des études épidémiologiques réalisées chez des patients atteints de maladies inflammatoires telles que la sclérose en plaque, le diabète de type I ou la maladie de Crohn ont montré une association entre une déficience en vitamine D et le statut inflammatoire des patients.

La vitamine D dérivée de l'exposition au soleil ou de l'alimentation est d'abord catabolisée en 25OHD. La 25OHD est la principale forme circulante de la vitamine D, mais semble inactive en tant que molécule de signalisation. La forme active de la vitamine est la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂D). Des études *in vitro* ont montré que la 1,25(OH)₂D modulent les réponses cellulaires T (cellules impliquées dans la réponse immunitaire anti-FVIII) et favorise le développement de cellules T régulatrices.

Ici, nous proposons d'étudier l'influence de la vitamine D sur la réponse immunitaire anti-FVIII chez un modèle murin d'hémophilie A. Les expériences avec des animaux sont le seul moyen d'étudier l'effet protecteur de la vitamine D sur la réponse immunitaire anti-FVIII car l'interaction complexe de la molécule 1,25(OH)₂D avec les cellules immunitaires (cellules présentatrices de l'antigène, cellules T et cellules B) au cours du traitement avec le FVIII ne peut pas être modélisée *in vitro*. La souris déficiente en FVIII représente un modèle pré-clinique d'hémophilie A bien établi pour l'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII, car comme chez les patients, les souris développent une réponse anticorps anti-FVIII de manière T-dépendante après plusieurs injections de FVIII par voie intraveineuse. Pour ce projet d'une durée de 3 ans, nous prévoyons d'utiliser 120 souris déficiente en FVIII. Nous avons strictement suivi le principe des 3 R durant la conception de ce protocole.

Remplacement : ce 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, soit ici l'interaction de la forme active de la vitamine D avec les cellules du système immunitaires. Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes *in vitro* pour analyses ultérieures.

Réduction: Le nombre de répétition des expériences sera défini de manière rationnelle : si une expérience donne des résultats statistiquement significatifs avec une puissance appropriée, elle ne sera pas répétée, sinon elle sera répétée une à deux fois maximum. Les organes, sérum et cellules des souris sacrifiées en fin d'expérience sont conservés; ainsi, aucune expérience supplémentaire ne doit être faite si des questions nouvelles surviennent.

Raffinement : les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique françaises. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les animaux malades seront soignés ou euthanasiés. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

La démonstration d'une influence de la vitamine D sur la réponse immunitaire anti-FVIII chez le modèle murin d'hémophilie A pourrait encourager la mise en place d'un suivi régulier des taux de vitamines D chez les patients hémophiles A et la supplémentation des patients en vitamine D afin de réduire les risques d'apparition d'inhibiteurs du FVIII.

16279 Le cortex cérébral est une région du cerveau qui nous permet de percevoir notre environnement, établir des réponses adaptées et réaliser des tâches cognitives élaborées. Ces fonctions reposent en partie sur la mise en place de connexions nerveuses qui relient entre elles des régions distantes du cerveau, et qui commencent à se mettre en place au cours du développement embryonnaire suivant une orchestration précise aussi bien spatiale que temporelle. Il a été montré que certains défauts de ces connexions nerveuses pouvaient être « corrigés » autour de la naissance grâce à une incroyable plasticité des axones à retrouver leurs cibles. Néanmoins, il est également connu qu'une naissance prématurée ou des infections survenant pendant la grossesse pouvaient être des facteurs de risques pour des pathologies neurologiques et psychiatriques dû à une perturbation du fonctionnement du cortex cérébral. Il apparaît donc très important de déterminer d'une part comment le cortex cérébral se développe en conditions normales pour pouvoir d'autre part déterminer les causes de ces diverses pathologies. Notre laboratoire aborde ces questions en utilisant le modèle de la souris car il permet les manipulations génétiques et expérimentales, et les mécanismes de développement de son cerveau sont proches de celui de l'homme.

Dans ce projet, nous allons analyser la mise en place et la plasticité des connexions axonales du le cortex cérébral et étudier le rôle des cellules immunitaires du cerveau dans ces processus.

La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale, notamment la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Les méthodes alternatives à l'utilisation du

modèle murin sont malheureusement limitées pour répondre à nos questions scientifiques néanmoins, les manipulations *in vitro* seront utilisées à la place du modèle *in vivo* dès que la problématique le permet. De plus, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum nécessaire pour répondre à la question scientifique et les expériences réalisées seront optimisées dans la mesure du possible. L'inconfort des souris sera réduit au maximum grâce à l'utilisation d'anesthésique et d'analgésiques. En effet, les procédures sont bien établies et n'induisent ni douleur, ni angoisse ou stress. Les animaux sont manipulés par du personnel compétent et l'environnement enrichi.

Ce projet de recherche nécessitera maximum 3696 animaux.

16280 La description et la compréhension des facteurs qui affectent la circulation d'agents infectieux dans les populations animales sauvages sont importantes d'un point de vue fondamental, mais aussi appliqué, notamment dans le cas de maladies émergentes. C'est notamment le cas pour des espèces actives à l'interface entre des milieux naturels et le milieu urbain, tels que les goélands. Les goélands, de par leur large distribution, leur relative abondance et leur écologie, peuvent être des espèces sentinelles ou responsables de la dissémination de certains agents. Dans ce contexte, le présent projet vise à étudier les relations entre les déplacements de goélands leucophée (*Larus michahellis*) et leur exposition à des agents infectieux et polluants. Les informations sur le déplacement d'individus reproducteurs seront obtenues par la pose d'appareils électroniques (GPS) sur des oiseaux capturés sur leur nid puis relâchés. Les informations sur l'exposition des individus à des agents infectieux seront déterminées par la réalisation de prélèvements (sang, écouillons cloacaux et buccaux) sur des adultes reproducteurs et des poussins. Afin de tester si des individus en échec de reproduction effectuent des déplacements différents d'individus élevant de jeunes poussins et parce que des actions de gestion des populations implémentées sur certains sites impliquent la mise en échec de reproduction d'individus, une partie des GPS seront déployés sur des individus ayant eu leurs œufs enlevés ou stérilisés. L'utilisation d'appareils électroniques GPS permettant d'accéder aux données à distance (système de transmission radio) permettra de ne pas avoir à recapter les individus reproducteurs pour obtenir les données, ce qui limite leur dérangement tout en optimisant l'obtention de données importantes. Les manipulations concerneront 200 adultes sur une période de 5 années pour les prélèvements, dont un maximum de 80 sera équipé de GPS. Les prélèvements réalisés sur des poussins pendant leur période d'élevage concerneront une centaine de poussins par an, pour un maximum de 500 poussins pour une période de 5 années. L'espèce étudiée, le goéland leucophée, a fait l'objet de nombreuses études sur ses comportements, sa reproduction, sa physiologie et sa démographie : les manipulations prévues ne devraient qu'avoir un impact limité en termes de dérangement, sachant qu'elles seront conduites par du personnel ayant une forte expérience de ce type d'espèce. L'étude porte spécifiquement sur la circulation d'agents infectieux dans des populations non-captives vivant à l'interface entre le milieu urbain et le milieu naturel, donc l'espèce sauvage utilisée, le goéland leucophée, ne peut être remplacée. Les tailles d'échantillons ont été déterminées en considérant les critères de réduction et de raffinement pour permettre des comparaisons pertinentes (i) des taux d'exposition aux agents infectieux entre groupes d'individus échantillonnés, ainsi que (ii) des déplacements des catégories d'individus considérés. Les protocoles expérimentaux ont été élaborés afin de minimiser la douleur et l'inconfort en faisant intervenir un personnel expérimenté pour les manipulations et en effectuant les prélèvements rapidement (moins de 5 min) et sans anesthésie. Les oiseaux sont relâchés rapidement sur le site de leur capture.

16281 La polyarthrite rhumatoïde (PR) entraîne douleurs et handicaps. Les patients souffrent d'une inflammation articulaire, évoluant par poussée et dégradant chaque fois un peu plus leurs articulations. La PR réduit non seulement la qualité de vie, mais également l'espérance de vie du fait de complications cardiovasculaires. Son coût est élevé pour la société.

La douleur est la première raison poussant les patients atteints de PR à consulter un rhumatologue. Sur la base d'observations cliniques et des réponses aux traitements, il semble que la phase initiale de la maladie soit dominée par des mécanismes impliquant une douleur inflammatoire directe. Avec la chronicité de la maladie, la douleur évolue par la suite vers des mécanismes neuropathiques. Bien que l'inflammation et l'atteinte articulaire puissent provoquer des douleurs, certains patients se plaignent de

douleurs plus sévères qu'attendu, tandis que d'autres patients se plaignent de douleurs articulaires en absence d'inflammation ou d'atteinte articulaire. L'hyperalgésie peut être le résultat d'une sensibilisation dans lequel le seuil d'excitabilité des neurones nociceptifs est abaissé.

Certaines cytokines induisent le développement d'une hyperalgésie en agissant directement sur les neurones. De nombreuses études ont montré que des cytokines inflammatoires jouaient un rôle majeur dans les mécanismes de la douleur, notamment l'IL-6 via la voie de signalisation JAK. Un travail récent a montré des différences notables dans la prise en charge de la douleur par un inhibiteur de JAK (baricitinib) et un inhibiteur du TNF- α (adalimumab) chez des patients atteints de PR.

Il existe donc un besoin de développer de nouveaux outils thérapeutiques agissant à la fois sur la douleur et sur l'inflammation.

L'objectif de ce projet est d'obtenir des résultats précliniques en lien avec l'évaluation de la douleur dans des modèles expérimentaux d'arthrite. Le but étant ensuite d'évaluer l'efficacité de traitements anti-inflammatoires sur la douleur dans la phase initiale des arthrites et dans la phase chronique.

Les mécanismes que nous souhaitons étudier demandent d'avoir un système immunitaire complet et proche de celui de l'homme. L'utilisation de la souris est donc tout indiquée dans cette étude, et se fera en accord avec la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés dans les différentes procédures d'arthrite sera réduit au maximum afin de permettre des analyses statistiques solides. Des points limites destinés à limiter l'inconfort et la douleur des souris seront mis en place dans chaque expérience et tous les animaux seront pesés et leur comportement surveillé afin de veiller à leur bien-être. Ce projet de recherche nécessitera l'utilisation de 260 souris au maximum sur 4 ans.

16282 Les dysfonctions de l'automatisme du nœud sino-atrial, le centre rythmogène du cœur, sont des conditions cliniques très communes (60% des consultations en rythmologie). La bradycardie est définie comme une fréquence cardiaque de base et/ou à l'effort trop basse pour répondre à la nécessité physiologique de l'organisme. La bradycardie se manifeste par un rythme de base bas (avec risque de syncope) et une incapacité du système sympathique à augmenter la fréquence à l'effort. La bradycardie est responsable de l'implantation de plus de 500000 pace-makers électroniques en Europe chaque année. Les études cliniques montrent que cette statistique va doubler au cours des 50 prochaines années, avec une flambée des coûts matériels et humains. Bien que les pace-makers modernes soient hautement performants, ils sont également très coûteux et nécessitent d'un suivi permanent. En plus, l'implantation d'un pace-maker constitue une opération irréversible et peut donner lieu à des complications, particulièrement chez des sujets jeunes ou en cardiologie pédiatrique. Dans un avenir proche, il sera donc de plus en plus important de disposer des nouvelles stratégies thérapeutiques et, tout particulièrement, des thérapies pharmacologiques.

La fréquence cardiaque est générée au niveau du nœud sino-atrial par un ensemble des canaux ioniques et de protéines qui régulent la dynamique du calcium intracellulaire. Quatre canaux ioniques majeurs sont exprimés dans le nœud sino-atrial. On trouve les canaux activés par l'hyperpolarisation f-(HCN4), les canaux calciques de type L Cav1.3 sensibles aux dihydropyridines (DHPs) et les canaux de type TCav3.1. Les connaissances actuelles montrent que ces trois canaux ioniques contribuent au rythme du cœur en accélérant la fréquence cardiaque. De plus, des pertes de fonction congénitales dans l'activité de ces canaux sont à la base de bradycardies congénitales chez l'humain. Toutefois, l'importance relative de ces canaux dans la détermination de la fréquence cardiaque sur l'action du système sympathique et parasympathique n'est pas comprise. D'autre part, les canaux potassiques activés par l'acétylcholine et le G-protéines (IKACH- Girk4) contribuent au ralentissement de la fréquence cardiaque sous l'action du système nerveux parasympathique. Des données récentes montrent que chez l'humain, l'activation excessive de Girk4 est responsable d'une bradycardie congénitale. Les cellules sino-atriales des souris déficientes en courant IKACH (Girk4 $^{-/-}$) montrent une perte partielle de la sensibilité de la fréquence à l'action du système nerveux parasympathique.

Toutefois, le rôle physiopathologique de ces canaux dans la régulation de la fréquence cardiaque n'est pas entièrement compris et à présent, les bases mécanistiques qui lient la perte ou le gain de fonction de ces canaux à la pathologie rythmique humaine ne sont pas connues. De plus, le rôle du système nerveux autonome dans la mise en place des symptômes de la bradycardie n'est pas connu. Pour

répondre à ces questions fondamentales il est important de comprendre le rôle de ces canaux ioniques dans la régulation sympathique et parasympathique de la fréquence cardiaque.

Notre projet utilise une collection de génotypes de souris génétiquement modifiées qui est unique au monde pour l'étude du rôle des canaux ioniques mentionnés plus haut dans la régulation de la fréquence cardiaque et la bradycardie. Ces lignées constituent en plus des modèles fiables des bradycardies congénitales. Notre programme de recherche a deux objectifs: (i) identifier le rôle de ces canaux ioniques dans la régulation de la fréquence cardiaque et du remodelage cardiaque

(ii) comprendre comment l'interaction entre l'entre le système nerveux autonome et ces canaux de la cellule du nœud sinusal génère les symptômes de la bradycardie. Nous proposons l'étude de la fonction cardiaque par échocardiographie. Cette technique non-invasive permet d'obtenir des informations cruciales sur la fonction cardiaque régulé par la fréquence cardiaque en utilisant un minimum d'animaux. Dans ce cadre, nous allons suivre la fonction cardiaque des souris génétiquement modifiées pendant 3 mois avec l'administration soit d'un placebo (sérum physiologique) soit d'angiotensine II en implantant des pompes osmotiques sous la peau de l'animal. L'analyse des résultats va nous montrer, pour la première fois, comment ces canaux ioniques interviennent dans la régulation de la fonction cardiaque et sous l'action du système nerveux autonome.

Respect de la règle des 3R.

Réduction. Cette étude sera réalisée sur un total de 408 souris mâles et femelles de 17 différents génotypes. Ces génotypes sont tous centrés autour des 4 canaux ioniques présentés plus haut. Ce nombre permettra une analyse statistique fiable des résultats obtenus et de comparer la régulation de la fréquence en fonction du génotype, de l'activité du système nerveux autonome et du sexe de l'animal. 24 souris sauvages C57Bl6/J (12 mâles/12 femelles) vont servir de contrôle extra portées car, par soucis de réduction des animaux produits et utilisés, les autres génotypes expérimentaux sont élevés en sorte de réduire au stricte nécessaire les génotypes intermédiaires. Les résultats qui assurent la bonne qualité de cette démarche ont été obtenus dans les années passées. Remplacement. La fréquence et les arythmies cardiaques sont des phénomènes complexes résultant des interactions entre les cardiomyocytes, dont l'activité électrique est normale ou altérée, les fibroblastes cardiaques (70% des cellules cardiaques) et le système nerveux autonome. Ce niveau d'intégration ne peut être obtenu que sur un modèle animal.

Raffinement. Les souris seront hébergées en cages ventilées enrichies de papier pour réaliser des nids. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie avec une prise en charge analgésique adaptée à chaque étape.

16283 Le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) est un virus émergent, identifié pour la première fois à Wuhan en Chine en décembre 2019. Il est responsable d'une maladie pandémique appelée maladie à coronavirus 2019 (COVID-19). Cette maladie, hautement contagieuse, touche actuellement plus de 2,9 millions de personnes dans le monde et est responsable de plus de 200 000 décès. La principale cause de décès secondaire à cette infection est liée à l'apparition secondaire d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Celui-ci apparait souvent à 10 jours du début des symptômes et semble être provoqué par une réponse inflammatoire excessive. Dans ce contexte, de nombreuses molécules anti-inflammatoires sont testées afin d'enrayer ce mécanisme inflammatoire. L'Anakinra, un antagoniste de l'IL-1, via une liaison compétitive à son récepteur, l'IL-1R1 fait parti de ces molécules. Ce traitement a montré quelques résultats encourageants chez des patients atteints de SRAS-CoV-2. Cette information nous amène à penser que ce traitement pourrait être efficace dans tout SDRA. Afin de confirmer cette hypothèse, il nous semble nécessaire de prouver l'implication de l'IL-1 dans la sévérité du SDRA. De nombreux mécanismes complexes impliquant l'interaction directe et/ou indirecte d'un grand nombre d'acteurs immunologiques sont présents dans le SDRA. Afin de déterminer le rôle précis d'une molécule, il nous paraît indispensable de réaliser les expériences sur des animaux génétiquement modifiés exprimant un niveau variable de cette molécule à étudier. Nous avons choisi d'utiliser un modèle murin (petit animal), qui permet de répondre aux questions scientifiques posées et pour lequel nous avons toute l'expertise et les outils nécessaires. Ainsi, nous utiliserons des souris ayant un Knock Out (KO) spécifique du gène du récepteur de l'IL-

1Ra. Nous étudierons la réponse inflammatoire pulmonaire chez ces souris dans un modèle de SDRA et comparerons avec des souris ne présentant pas ce déficit. Par ailleurs, il a récemment été montré que les lymphocytes T folliculaires helper (Tfh), population T stimulant la production d'anticorps par les lymphocytes B, et, les lymphocytes T folliculaires régulateurs (Tfr), population contrôlant l'activation des Tfh, expriment des récepteurs de l'IL-1. En effet, les Tfh expriment IL-1R1, récepteur agoniste de l'IL-1 alors que les Tfr expriment l'IL-1R2 et l'IL-1Ra, les récepteurs inhibiteurs de l'interleukine 1 (IL-1). L'axe Ces données nous amènent à poser l'hypothèse que l'implication de l'IL-1 dans le SDRA post coronavirus pourrait faire intervenir les Tfh et les Tfr. Nous pourrions tester cette hypothèse en étudiant la réponse inflammatoire pulmonaire chez des souris ayant un KO spécifique des récepteurs IL-1R2 (+/- IL-1Ra) uniquement sur les Tfr et en IL-1R1 sur les Tfh dans le même modèle de SDRA. Ce projet a pour vocation principale de faciliter la compréhension des mécanismes sous-tendant l'initiation d'un SDRA post-COVID mais aussi un SDRA en général. Si l'IL-1 était en effet impliquée dans le SDRA toute cause confondue, un traitement par Anakinra pourrait être proposé à l'ensemble des patients souffrant de SDRA. La souris est un modèle validé en immunologie et particulièrement dans les études visant à améliorer la compréhension physiopathologique de voie de signalisation. Nous nous efforcerons de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés en ajustant au mieux les protocoles pour obtenir des résultats statistiques robustes tout en tenant compte de la variabilité inter-individuelle des animaux testés. Les animaux sont autant que possible hébergés en groupe (tant que les protocoles le permettent), pour respecter leur vie sociale. La souris est un modèle valide en immunologie et particulièrement dans les études visant à mieux décrire les mécanismes modulant la réponse immunitaire. Aucune alternative à l'utilisation d'un modèle murin n'est disponible pour cette recherche. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur le principe de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Nous utiliserons au total 180 souris C57BL/6. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal et tenant compte de l'effectif minimal pour atteindre une puissance statistique suffisante (Calculée avec G*Power). Par exemple, seule une les stratégies validées précédemment par d'autres équipes chez des souris seront réalisées ici. Par ailleurs, nous veillerons systématiquement à diminuer les contraintes et la douleur qui peuvent être liées à la mise en œuvre expérimentale, notamment par une période d'habituation systématique avant expérimentation, un hébergement amélioré, des points d'arrêt anticipés et le recours à des anesthésie et analgésie pour limiter la douleur.

16284 L'objectif du projet est de tester la capacité d'un gène à modifier des cellules de la moelle osseuse dans le but de les utiliser en traitement pour régénérer la cornée et la vision.

Normalement, les cellules de la cornée assurent le maintien de sa transparence et participent à la préservation de la surface oculaire. Dans certaines maladies de la cornée (génétiques, inflammatoires, iatrogénie...), ces cellules ne remplissent pas leur rôle ou peuvent être complètement détruites, ce qui entraîne une opacification de la cornée et une perte de vision.

Pour remplacer ces cellules malades ou détruites, nous souhaitons utiliser des cellules de substitutions, qui peuvent être prélevées au niveau de la moelle osseuse, les cellules mésenchymateuses. Ces cellules ont des caractéristiques proches de celles présentes dans la cornée, à l'exception notamment de l'expression d'un gène qui régule le développement de l'œil. La perte de fonction de ce gène, liée à une mutation, est responsable de maladies sévères de la cornée et de la surface oculaire.

Nous souhaitons vérifier qu'insérer ce gène dans les cellules mésenchymateuses permet de rendre les cellules capables de régénérer la cornée, que ce soit pour le traitement de cicatrices cornéennes ou la préservation de la surface oculaire.

Les cellules seront générées en laboratoire selon des techniques dont la méthodologie permet un transfert directement à l'Homme. Les cellules seront triées puis elles seront greffées dans la cornée de souris. Dans un premier temps, les cellules seront injectées sur des souris naïves de toute procédure afin de vérifier que les cellules ne modifient pas la cornée. Puis, les souris recevront les cellules, soit au même moment soit à distance de l'induction d'une cicatrice cornéenne dans le but de tester leur rôle pour la réduction de l'inflammation cornéenne et pour le traitement des cicatrices cornéennes

constituées. Les cellules seront également utilisées pour tester leur capacité à préserver les cellules de la surface oculaire après avoir l'avoir endommagé.

Ces procédures sont de sévérité modérée.

380 animaux seront consacrés pour l'ensemble des phases du protocole, conférant la possibilité de mettre en évidence la capacité des cellules à régénérer la surface de la cornée avec une puissance de 95% et un risque alpha de 0.05. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin du protocole pour permettre l'analyse histologique, immunohistochimique et en biologie moléculaire.

Nous avons tenu compte de la règle des 3R pour respecter les bonnes pratiques en expérimentation animale.

Remplacer: toutes les expériences *in vitro* ont été réalisées et seules les expériences *in vivo* restent à faire pour passer aux essais thérapeutiques chez l'Homme. Le choix de la souris est incontournable pour des études précliniques de la cornée.

Réduire: nous avons limité aux seules expériences indispensables le protocole proposé. La réalisation en phases successives permettra de limiter le nombre d'expériences. La méthodologie proposée a déjà été validée et permet d'aller directement à l'essentiel de la validation de notre approche originale.

Raffiner : tout ce projet sera réalisé avec une attention particulière portée sur le bien-être de l'animal : en cas de modification physique et/ou comportementale (prostration, alimentation, hygiène) non amélioré par les antalgiques ou en cas de complication locale (infection, perforation), nous procéderons à l'euthanasie de l'animal.

16285 La cicatrisation des plaies cutanée s'effectue selon un processus bien établi. Une blessure cutanée entraîne une cascade d'évènement successifs : une hémostasie, une inflammation, une prolifération (formation de nouveaux tissus) et enfin un remodelage (résolution de l'inflammation) afin de permettre le rétablissement de la barrière cutanée. Parmi les nombreuses cellules recrutées dans le microenvironnement de la plaie, les macrophages jouent un rôle indispensable et antagoniste dans la cicatrisation puisqu'ils sont acteurs tant dans la mise en place de l'inflammation que dans sa résolution. Pour cela ils subissent une adaptation et passent d'un phénotype pro-inflammatoire à un phénotype anti-inflammatoire.

Dans des états pathologiques, comme celui du diabète, une ou plusieurs de ces phases sont altérées ainsi que la plasticité des macrophages, empêchant une bonne cicatrisation. La plaie reste ouverte et inflammée, ce qui, à terme, peut mener à une amputation. La plasticité des macrophages est essentielle dans l'initiation, la réparation et le remodelage des plaies.

Lors de précédentes études sur l'adaptation métabolique des macrophages dans un contexte diabétogène, il a été montré que le gène codant pour l'élongase ELOVL2 (élongation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne) est impliqué et nécessaire dans la résolution de l'inflammation.

C'est pourquoi dans ce projet nous souhaiterions évaluer le rôle de ce gène dans la cicatrisation des plaies cutanée, toujours dans un contexte diabétogène. Pour ce faire nous allons mettre des souris invalidées ou non pour ce gène dans les macrophages, sous régime normal (souris contrôles) ou sous un régime riche en graisse. Au total 160 animaux seront nécessaires. Au bout de 8 semaines de régime, des plaies cutanées seront réalisées sur les souris, puis nous évaluerons les différences de cicatrisation au bout de 2, 5 et 14 jours. Nous observerons également la cicatrisation totale des souris sur 4 semaines. A tous ces temps des études d'observation de cicatrisation des plaies mais également des études histologiques et de biologie moléculaire seront réalisées.

La recherche animale est indispensable pour ces études qui ne peuvent se faire en *in vitro*. Cela nous aidera à mieux comprendre les acteurs et les mécanismes pathologiques et thérapeutiques des problèmes de cicatrisation dans le diabète. La stratégie des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera donc respectée. En effet, le nombre d'animaux utilisé confère une puissance statistique satisfaisant de plus la réalisation de deux biopsies par animal permet de diviser par deux le nombre d'animaux requis, puisque les études de biologie moléculaire ainsi que les études histologiques seront possible sur le même animal. Une attention toute particulière sera portée afin d'éviter aux animaux de souffrir. Les animaux seront acclimatés à l'animalerie et seront habitués à être manipulés avec un suivi de poids

hebdomadaire (pendant la durée du régime) puis quotidien lorsque les souris auront subi des lésions cutanées, ce qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux. La réalisation des biopsies sera effectuée uniquement sous anesthésie. Un enrichissement sera également disposé dans les cages ("maisons" en cartons) afin d'éviter au maximum que les souris ne blessent entre elles.

16286 Le paludisme est dû à l'infection par le parasite Plasmodium, qui débute par une phase asymptomatique de multiplication parasitaire dans le foie, cible idéale pour des approches anti-paludiques vaccinales ou thérapeutiques. Nous étudions les mécanismes moléculaires impliqués dans l'infection du foie par Plasmodium, en utilisant des modèles d'infection de la souris par des Plasmodium de rongeurs (Plasmodium berghei, Plasmodium yoelii). Ces modèles murins permettent d'une part de caractériser les mécanismes d'infection *in vivo*, notamment par des approches de génétique moléculaire, d'autre part d'évaluer de nouvelles approches vaccinales et/ou thérapeutiques, avant des essais chez l'homme.

Le projet comporte deux volets: un volet mécanistique, qui vise à caractériser les mécanismes d'entrée des sporozoïtes de P. berghei et P. yoelii dans les cellules du foie, et un volet translationnel, qui vise à évaluer dans des modèles pré-cliniques de nouvelles formulations vaccinales contre le paludisme.

Afin d'étudier l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de Plasmodium, nous utilisons deux parasites de rongeurs, P. berghei et P. yoelii, qui peuvent être transmis de façon expérimentale à la souris. Au total, le projet sur 3 ans requiert un total de 350 souris. À chaque fois que possible, et notamment pour l'étude de l'entrée du parasite dans les hépatocytes, nous utiliserons des approches de remplacement reposant sur des modèles *in vitro* d'infection de cultures cellulaires. L'utilisation d'une stratégie de tri des parasites transgéniques par FACS permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. L'analyse phénotypique par bioluminescence *in vivo* permettra des analyses répétées dans le temps et donc de réduire également le nombre de souris utilisées, notamment dans les expériences d'immunisation. Cette méthode non invasive contribuera aussi au raffinement du protocole, ainsi que l'anesthésie des souris lors de certaines procédures. Afin de contribuer au raffinement des procédures, les animaux sont par ailleurs hébergés avec leurs congénères (2 à 6 par cage) dans un milieu enrichi (lanières de papier Kraft ou équivalent). Une période d'acclimatation d'une semaine sera observée avant le début des expérimentations.

16287 Les perturbations des conditions de développement peuvent avoir des effets durables sur la cognition. L'étude de ces impacts est cruciale pour comprendre l'ontogenèse de la cognition, ainsi que les origines des troubles cognitifs. Chez les oiseaux, la température d'incubation des œufs représente un aspect critique du développement. Des modifications des températures d'incubation (<1°C) affectent la morphologie et la physiologie des jeunes produits. Cependant, l'impact de ces modifications sur la cognition reste peu étudié. Dans cette étude, suite à la reproduction, des œufs de diamants mandarins (*Taeniopygia guttata*) seront incubés à trois températures (36°C, 37°C, e 38°C) et les oiseaux seront suivis jusqu'à l'âge adulte. L'impact de ces régimes thermiques sur les (1) capacités d'apprentissage et de mémorisation des oiseaux sera mesuré, ainsi que sur (2) les mécanismes physiologiques associés (hormones et métabolisme). Ce projet sera associé avec des prélèvements sanguins, des mesures de métabolisme et des tests comportementaux. Cette étude sera fondée sur l'utilisation de 30 couples de diamants mandarins et sur les 90 œufs/poussins qui en seront issus (30 œuf/poussin par régime thermique) pour un total de 150 individus. La règle des 3R a été prise en compte de la manière suivante. Remplacement : l'étude concerne spécifiquement la physiologie et le comportement de cette espèce pour laquelle la littérature disponible permet la bonne interprétation des résultats. Il n'est pas possible de remplacer. Réduction : Le nombre d'individus sera réduit au maximum (30 œufs/poussins par groupe) pour permettre de détecter des différences significatives. Raffinement : les individus seront gardés dans des conditions de captivité optimale et l'angoisse associée aux procédures sera réduite au maximum (minimisation du temps de manipulation et de procédure et conditions d'hébergement temporaire optimisées).

16288 Il existe en Europe plusieurs programmes de suivi des contaminants chez les oiseaux marins. En France pourtant, il n'y a pas de surveillance chez ces organismes. La Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) donne l'objectif d'atteinte du bon état écologique (BEE), et il existe déjà un suivi de la contamination dans les sédiments, chez les bivalves, les gastéropodes et les poissons. Dans le cadre de l'obligation à atteindre le BEE sur les masses d'eau côtières et marines françaises, ce projet vise à ajouter à ces suivis la surveillance des oiseaux marins, prédateurs supérieurs susceptibles d'accumuler de fortes quantités de polluants, et potentiellement sensibles à ces derniers. Cet indicateur correspondra au descripteur 8 « contaminants ».

Ces données seront utilisées pour l'évaluation du BEE en 2024, puis pour chaque rapportage DCSMM. Deux objectifs sont visés : quantifier les niveaux de contaminations des oiseaux marins, et mesurer les effets de ces contaminants.

Une stratégie de suivi a été déterminée, basée sur la répartition des espèces, leur régime alimentaire, leurs distances d'alimentation, et leur statut de conservation.

1950 individus au maximum seront inclus dans le projet et répartis de la façon suivante :

- piscivores côtiers (cormoran huppé *Phalacrocorax aristotelis* - 270)
- piscivores pélagiques (fou de Bassan *Morus bassanus* – 30, puffin cendré *Calonectris diomedea* - 120)
- généralistes côtiers (goéland marin *Larus marinus* – 330, goéland brun *Larus fuscus* -390, goéland leucophée *Larus michahellis* – 450, goéland argenté *Larus argentatus* -360)

Le mercure sera suivi dans les plumes, les polluants organiques (DDT, PCBs, PBDEs, PFOS) et les éléments traces (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, V et Zn) dans le sang.

Le projet se soumet à la problématique des 3 R : remplacer, réduire, raffiner

- Remplacer : les oiseaux marins sont des espèces sauvages, qui intègrent des contaminants présents dans le milieu, et y sont potentiellement sensibles. Ils ne peuvent être remplacés par des cultures *in vitro* ou des individus captifs. Ils sont des bioindicateurs de la contamination des milieux.
- Réduire : Le choix des 15 individus/site/espèce est le minimum qui a été défini pour maintenir une robustesse statistique, et garantir la prise en compte de variabilités inter-individuelles.
- Raffiner : - L'intervention sera rapide, en concertation avec les acteurs de terrain locaux (connaissance des sites, donc optimisation du temps de manipulation). Elle sera si possible coordonnée avec des opérations de baguage (une seule manipulation d'oiseau pour un maximum d'informations)

Les facteurs météo seront pris en compte (pas d'intervention si les risques pour les oiseaux sont élevés)

Diminution du stress des individus manipulés par apposition d'un tissu opaque sur les yeux

Les plumes seront prélevées sans les couper pour assurer une repousse rapide

Une grande attention sera portée à la réalisation de la prise de sang (pas de création d'hématome ou de saignement)

Suite au prélèvement sanguin, une pression sera exercée sur la zone piquée pour faciliter la coagulation.

16289 Au cours des dernières décennies, des modifications de facteurs environnementaux, notamment le régime alimentaire, l'exposition aux antibiotiques et les polluants, ont été supposées être les principaux facteurs expliquant l'augmentation de l'incidence du diabète de type 1 (DT1). Cette hypothèse est corroborée par la hausse rapide de l'incidence du DT1 dans les pays occidentaux, impossibles à expliquer en se basant uniquement sur des modifications génétiques. De toute évidence, les modifications de l'environnement modifient le microbiote intestinal directement exposé à cet environnement. Par conséquent, le microbiote intestinal est probablement le chaînon manquant entre l'environnement et le développement de maladies auto-immunes, y compris le DT1. Des études récentes démontrent le rôle central des métabolites dérivés du microbiote intestinal dans le fonctionnement normal de nombreux organes périphériques. En conséquence, des altérations du

microbiote intestinal ont été associées à des maladies organe-spécifiques, notamment le diabète de type 1. Un microbiote intestinal sain est essentiel au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale et de la tolérance immunitaire dans l'intestin mais également dans les organes distants. Le microbiote intestinal peut apparaître comme une cible thérapeutique attrayante contre le DT1; toutefois, le remodeler le microbiote intestinal en utilisant une greffe de microbiote fécal ou des probiotiques peut être difficile, avec uniquement des effets transitoires et la présence d'effets indésirables potentiels. Une approche plus appropriée consisterait à utiliser des molécules capables à la fois de remodeler le microbiote intestinal, de promouvoir la barrière épithéliale intestinale et de restaurer l'homéostasie immunitaire. Les peptides antimicrobiens (AMPs), pourraient être de bons candidats pour restaurer l'homéostasie intestinale. Considérant les diverses fonctions des AMPs dans le maintien de l'homéostasie intestinale et le rôle potentiel de l'inflammation intestinale dans le DT1, il apparaît urgent de déterminer comment les AMPs dans l'intestin pourraient réguler le développement du DT1 et, par conséquent, représenter de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes.

Les modèles animaux représentent un outil incontournable dans l'étude des mécanismes immuno-pathologiques. Aucun modèle *in vitro* alternatif n'est disponible pour étudier les mécanismes immunitaires complexes intervenant dans la physiopathologie du diabète auto-immun, la régulation de l'homéostasie intestinale et du microbiote intestinal. Étant donné que le paramètre principal étudié dans ce projet est la survenue d'une maladie résultant d'un ensemble complexe d'acteurs cellulaires et de médiateurs solubles, le modèle murin est irremplaçable actuellement.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'expression des AMPs dans l'intestin d'un modèle murin développant spontanément le DT1 et de déterminer la capacité de certains AMPs à restaurer l'homéostasie intestinale et à prévenir le développement du DT1 dans ces souris.

Pour atteindre ces objectifs nous envisageons de traiter des souris NOD (non-obese diabetic, modèle spontané de diabète auto-immun) avec des AMPs par voie coloréctale et de développer une souche de souris invalidée pour un AMP spécifiquement au niveau intestinal.

Toutes les expérimentations sur l'animal seront conduites en respectant la règle des « 3 R ». Lorsque cela sera possible nous réaliserons des expériences *in vitro* sur des lignées de cellules pancréatiques pour réduire le nombre d'animaux utilisés. 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 robustes. Le nombre d'animaux par groupe et par procédure est réduit au minimum afin de pouvoir mesurer une différence entre les groupes avec une significativité $p < 0.05$. Les procédures sont les suivantes: 1) Procédure 1: Surveillance des nouvelles souches créées, 2) Procédure 2 : Évaluation de l'incidence du diabète, 3) Procédure 3: Traitement des souris par injection intrarectale de CRAMP.

Le nombre total d'animaux utilisés doit permettre de répondre sur les 5 années de la durée du projet aux objectifs de cette étude. Cette étude, prévue pour 5 ans, nécessitera au total 1620 souris.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. La perte de poids, le comportement de l'animal et la survenue du diabète seront suivis régulièrement. L'accès à l'eau pour une bonne hydratation des animaux diabétiques sera contrôlé quotidiennement. A la fin de chaque procédure, les animaux seront euthanasiés selon les méthodes autorisées dans l'annexe IV de l'arrêté relatif à l'agrément des établissements du 1er février 2013.

A terme, notre projet pourrait permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour prévenir le développement du diabète auto-immun en modifiant le microbiote intestinal.

16290 Les maladies rares et neurodégénératives souffrent d'une absence de prise en charge thérapeutique, accentuée par un vieillissement de la population. Ce projet permet d'identifier et caractériser des mécanismes d'action de cibles d'intérêts, de vérifier leur pertinence sur l'animal et d'identifier des biomarqueurs qui pourront par la suite être utilisés dans les études pré-cliniques dans des modèles pathologiques et/ou dans les études cliniques. Ce projet utilisera des rats ou souris sains, jeunes ou âgés. Les rats et les souris sont les espèces les plus couramment utilisées dans le domaine des maladies neurodégénératives. Elles ont l'avantage de fournir des souches stables et bien caractérisées, indispensable pour une bonne reproductibilité des modèles et ainsi une optimisation du

nombre d'animaux requis. Le choix entre le rat et la souris est fonction de la cible étudiée, de la sensibilité aux évaluations comportementales envisagées, et des éventuels modèles de pathologie dans lesquels les composés seront étudiés par la suite. En effet on privilégiera l'usage de la même espèce dans les 2 cas afin de réduire au strict nécessaire les études. Les procédures visent à administrer aux animaux, par voie systémique ou centrale, un composé sans effet secondaire attendu, afin de caractériser l'effet sur la cible biologique et d'identifier des biomarqueurs d'activité - par des tests cliniques (moteurs, cognitifs) et des dosages biochimiques sur les fluides ou les organes d'intérêts. Les traitements peuvent être répétés pendant quelques semaines, et autant que possible seront incorporés à la nourriture (ou eau de boisson). Des prélèvements sanguins répétés peuvent également être réalisés afin de vérifier l'évolution des biomarqueurs en cours de traitement.

L'ensemble des interventions peut entraîner un inconfort ou stress léger transitoire. Des phases d'habituation à la manipulation, à l'environnement et aux appareillages, un nombre limité de tests pour un seul animal, couplé à une surveillance quotidienne par du personnel compétent et formé aux observations de signes cliniques, et une utilisation d'anesthésiques et analgésiques les plus appropriés en cas de chirurgie (administration centrale), permettra de détecter et soulager tout inconfort de l'animal.

Afin de limiter le recours aux animaux, les composés sont sélectionnés préalablement sur les résultats obtenus dans des modèles *in vitro* ou également par modélisation informatique. Mais cette modélisation ne permet pas de rendre compte de la complexité des interactions et interdépendance des cibles biologiques. Pour s'assurer d'être au plus proche des pathologies humaines, il faut évaluer la complexité et l'interaction de l'intégralité des systèmes biologiques, les barrières physiologiques et les voies métaboliques, ce qui ne peut se faire que chez l'animal.

Un biostatisticien pourra être consulté pour optimiser le nombre d'animaux et le design à utiliser en fonction de l'objectif et des contraintes de l'étude (nombre de groupes, type de comparaisons, présence de répétitions), de la variabilité des paramètres mesurés, de la taille des effets à mettre en évidence et de l'historique des données. La manipulation des animaux, les techniques d'administration et de prélèvements sont réalisés selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec enrichissement adapté à l'espèce, interaction quotidienne avec le personnel.

A la fin de la procédure, les rongeurs sont anesthésiés pour des prélèvements de fluides, puis des prélèvements terminaux sans réveil peuvent être faits pour des dosages *ex-vivo* de biomarqueurs. Le nombre maximum d'animaux utilisés par le projet est estimé à 6000 pour les souris et 1500 pour les rats.

16291 Le cortex cérébral est une région du cerveau qui nous permet de percevoir notre environnement, établir des réponses adaptées et réaliser des tâches cognitives élaborées. Ces fonctions dépendent de l'activité de réseaux complexes de neurones, qui commencent à se mettre en place au cours du développement embryonnaire, lorsque l'embryon est confiné à son environnement maternel. Des perturbations dans l'environnement maternel peuvent altérer le développement du cortex cérébral comme l'illustre le fait qu'une infection pendant la grossesse est un facteur de risque pour l'émergence de maladies neurodéveloppementales, telles que les troubles du spectre autistique ou la schizophrénie. Ainsi, il est essentiel de comprendre comment les circuits s'assemblent et comment les signaux présents dans l'environnement maternel peuvent altérer ce développement. Dans ce contexte, nous nous intéressons aux microglies, les macrophages résidents du cerveau, qui sont des acteurs clés de la défense immunitaire innée contre les infections et les traumatismes cérébraux. Elles font parties des toutes premières cellules qui entrent dans le cerveau fœtal et elles sont situées à une interface clé entre le cerveau et l'environnement externe.

Dans ce projet, nous allons d'une part analyser le rôle des microglies dans l'émergence de ces circuits en conditions physiologiques et lorsque l'environnement maternel est perturbé, mais aussi caractériser le développement précoce des microglies.

Notre laboratoire utilise le modèle de la souris car il permet les manipulations génétiques et les mécanismes de développement de son cerveau sont proches de celui de l'homme. La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale, notamment la règle

des 3R. De ce fait, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum nécessaire pour répondre à la question scientifique et les expériences réalisées seront optimisées dans la mesure du possible. L'inconfort des souris sera réduit au maximum, les procédures étant bien établies et n'induisant ni douleur, ni angoisse ou stress. Les animaux sont manipulés par du personnel compétent et l'environnement enrichi. Il n'existe à l'heure actuelle pas de méthode alternative fiable à l'utilisation du modèle murin pour travailler sur les microglies mais nous resterons vigilants quant au développement de nouvelles méthodes.

Ce projet de recherche nécessitera environ 4536 animaux.

16292 Une réponse immunitaire efficace est dépendante des anticorps sécrétés par les lymphocytes B. L'activation et la maturation des lymphocytes B sont des mécanismes régulés dans les organes lymphoïdes par des lymphocytes T distincts, les cellules T folliculaires (TFH). Décrypter les mécanismes physiologiques mis en jeu par les cellules TFH pourraient ouvrir de nombreuses perspectives avec le développement de nouvelles thérapies vaccinales en promouvant ces cellules et en favorisant une mémoire immunologique plus efficace et/ou plus durable. A l'inverse, les cellules TFH peuvent également se déréguler et devenir pathogènes dans des contextes tumoraux (certains lymphomes) ou dans le contexte de maladies auto-immunes comme le lupus. Comprendre les mécanismes de dérégulation des cellules TFH pourrait donc permettre de découvrir de nouvelles cibles à bloquer dans certaines pathologies. Etudier les cellules TFH *in vitro* est à ce jour impossible car l'induction de différenciation de ces cellules nécessitent de nombreux signaux pas tous encore connus, de plus les interactions que ces cellules engagent avec les lymphocytes B ont lieu dans des zones particulières des organes lymphoïdes et à des temps précis, nécessitant donc des études *in vivo*.

Dans cette étude, nous nous attachons donc à décrypter comment une réponse vaccinale efficace et protectrice à long terme se met en place. Plus précisément, à l'aide de différents modèles de souris permettant d'étudier spécifiquement les cellules TFH et les lymphocytes B, ces travaux visent à mieux comprendre les interactions entre les cellules du système immunitaire et les molécules en jeu dans ces interactions. Cette étude est nécessaire pour a) mettre à jour de nouvelles stratégies vaccinales efficaces et b) étudier et découvrir de nouveaux mécanismes biologiques pouvant être la cible dans certaines pathologies. Dans son ensemble, ce projet aura donc un impact sur la conception de vaccins et par conséquent, la gestion des maladies infectieuses quelles soient bactériennes, virales ou parasitaires, mais également pour déterminer les mécanismes de différenciation pouvant être la cible de futures thérapies pour certaines maladies auto-immunes ou certains cancers.

Pour ce projet, nous nous limiterons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables, et ce dans le respect de la règle des 3Rs. Plus précisément, 1) Réduction du nombre d'animaux se limitera au nécessaire, 2) Raffiner la méthodologie utilisée, impliquant la notion de points limites, 3) Remplacer, quand possible, les modèles animaux par des approches d'expérimentation *in vitro*. Le nombre de souris nécessaire pour conduire ce projet est estimé à au plus 2831 souris/an, donc 14155 au total sur 5 ans.

16293 Les plaquettes, sont des cellules sanguines dépourvues de noyau produites par fragmentation des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Elles ont un rôle essentiel dans la prévention et l'arrêt de saignements.

L'augmentation (thrombocytose) ou la diminution (thrombocytopénie) anormale du nombre de plaquettes dans le sang sont le reflet d'une pathologie.

On distingue deux types de thrombocytopénies : i) la thrombopénie centrale qui résulte d'une faible production de plaquettes par la moelle osseuse, comme après une chimiothérapie ii) la thrombocytopénie périphérique due à une destruction massive des plaquettes circulant dans le sang, comme dans certaines maladies auto-immunes. Cette destruction est compensée par une activité médullaire accrue, qui entraîne une proportion plus importante de plaquettes jeunes, parfois dénommées plaquettes immatures. Ces dernières sont caractérisées par leur plus grande teneur en ARN et peuvent donc être identifiées et comptées utilisant des sondes fluorescentes de l'ARN. Chez

l'homme, la durée de vie des plaquettes est d'une dizaine de jours, les plaquettes jeunes, définies par un fort contenu en ARN, ont moins de 24h.

En clinique, l'analyse du pourcentage de plaquettes jeunes constitue un geste simple qui permet d'orienter facilement les démarches exploratoires en cas de thrombopénie isolée, mais cette détermination manque de précision. L'objectif de ce projet est de valider un marqueur alternatif fiable de plaquettes jeunes.

Les plaquettes, comme toutes les cellules d'un organisme expriment à leur surface des protéines glycosylées, c'est-à-dire des protéines qui ont subi au cours de leur synthèse un ajout de polymères constitués de sucres. Ce phénomène s'appelle la glycosylation. Au cours de leur vieillissement, la glycosylation des plaquettes s'altère et est décrite pour être responsable de leur élimination physiologique. Cette propriété, pourrait être utilisée pour développer un marqueur permettant de déterminer précisément le taux de plaquettes jeunes. Il s'agira dans ce projet de comparer les niveaux de glycosylation à la surface des plaquettes jeunes par rapport aux plaquettes plus âgées et d'étudier l'évolution de cette glycosylation au cours du vieillissement *in vivo* des plaquettes.

Réduire : Tous les tests pour mettre au point les immunomarquages ainsi que l'acquisition au cytomètre seront réalisés sur un même prélèvement. Les conditions expérimentales déterminées ainsi seront utilisées pour toutes les autres expériences. De plus, les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives.

Remplacer : l'étude de la glycosylation des plaquettes sanguines au cours de leur vieillissement ne peut être réalisé *in vitro*, car les plaquettes s'activent spontanément dans ces conditions, ce qui se traduit par des modifications de leur glycosylation. Elle peut donc se faire uniquement au moyen de modèles *in vivo*.

Raffiner : 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 cellulose et des lanières de papier afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux.

- Accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée des procédures expérimentales afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés.

Prise en charge péri-opératoire à l'aide d'une fiche de suivi pour évaluer l'état des animaux et veiller à leur bien être tout au long de l'expérimentation. Des critères d'interruption en fonction de l'aspect clinique des animaux (grille des score) seront mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux.

Ce projet nécessitera 162 souris.

16294 Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du système nerveux central (SNC). Ces cellules immunitaires ont non-seulement un rôle important dans les pathologies du SNC mais aussi lors du développement normal du SNC. Nos travaux précédents ont montré que la microglie module la maturation fonctionnelle des réseaux synaptiques thalamocorticaux et intracorticaux pendant le développement péri-natal du SNC. Nos données préliminaires suggèrent que le facteur de croissance neurotrophique BDNF est impliqué dans ce contrôle microglial du développement synaptique. Le but des expériences relatives à cette saisine est de tester la présence des ARNm codant pour le BDNF dans la microglie pendant le développement postnatal du cortex et ainsi mieux comprendre comment ces cellules immunitaires contribuent au développement cérébral.

Nous utiliserons pour cela en parallèle les approches de RNAscope (hybridation *in situ*) et de Ribotag (isolation des ARNm de la microglie directement à partir du tissu sans passer par une purification cellulaire). Dans ce but nous utiliserons des souris permettant l'expression conditionnelle de la Cre recombinase dans la microglie (Cx3cr1-CreERT2) que nous croiserons avec des souris floxées pour l'étiquetage des ARNm ou l'inactivation du gène *bdnf*. Cette approche nécessite l'injection intrapéritonéale de l'élément inducteur, l'hydroxytamoxifène.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante :

Remplacer : L'étude globale proposée chez la souris ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales dans la mesure où le phénotype microglial *in vitro* diffère de celui *in vivo*.

Réduire : Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum permis par les tests statistiques. Le protocole choisi, de classes légère, déjà utilisés en routine, limite la morbidité à moins de 10 %.

Raffiner : le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique et de recherche formé et qualifié. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et 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.

Ce projet nécessite 238 souris.

16295 La leucémie aiguë promyélocytaire (APL) est une forme agressive de leucémie aiguë myéloïde caractérisée par un blocage de la différenciation des leucocytes au stade promyélocytaire. Les APL sont causées par des remaniements chromosomiques conduisant à des fusions oncogéniques impliquant toutes le gène RARA (récepteur de l'acide rétinoïque alpha, RAR-alpha). Le traitement le plus courant de l'APL associe l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) à une chimiothérapie. Il existe plusieurs sous-types d'APL caractérisées par différentes fusions telles que PML-RARA ou PLZF_RARA. Ce dernier sous-type d'APL est assez rare puisqu'il ne représente que 5% des cas mais il représente un défi en santé publique car les patients présentant une fusion des gènes PLZF/RARA répondent moins bien à l'ATRA et ont un pronostic moins favorable. Il existe donc un réel besoin de développement de thérapies ciblées alternatives aux traitements standards.

Notre équipe de recherche s'intéresse depuis de nombreuses années au rôle de PLZF (pour "promyelocytic leukemia zinc finger") dans le développement de l'hématopoïèse pathologique. PLZF est un régulateur épigénétique, c'est à dire qu'il régule l'activité des gènes, sans mutation de la séquence d'ADN. Sa dérégulation dans la fusion PLZF/RARA entraîne donc potentiellement des modifications épigénétiques impliquées dans l'initiation de la leucémie et dans la résistance au traitement conventionnel par l'ATRA.

Nous souhaitons donc mener la présente étude afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces phénomènes de résistance, et tenter de valider de nouvelles perspectives thérapeutiques. Dans la présente demande d'autorisation, nous envisageons une approche expérimentale qui consistera à analyser le développement tumoral de souris greffées avec de la moelle leucémique PLZF/RARA. Nous utiliserons un modèle de souris immunodéficientes pour permettre l'évolution de la tumeur. Il s'ensuivra des traitements avec des inhibiteurs épigénétiques, en combinaison avec de l'acide rétinoïque (ATRA), pour étudier l'impact des drogues épigénétiques sur le développement tumoral et la résistance à l'ATRA.

Le nombre d'animaux prévus dans ce projet est estimé à 176 souris immunodéficientes.

Bien que le recours aux modèles murins soit rendu nécessaire par l'existence reconnue de mécanismes de régulation de la cellule leucémique par le microenvironnement, nous nous sommes attachés à remplacer et réduire le nombre d'animaux :

- Nous avons validé au préalable l'activité *in vitro* d'inhibiteurs épigénétiques sur la prolifération d'une lignée cellulaire exprimant la fusion PLZF/RARA et démontré des effets bénéfiques (diminution de la prolifération des cellules).

- Nous avons pu prédéfinir *in vitro* les traitements pertinents et les meilleures associations de molécules efficaces.

Il apparaît donc important au vu de ces résultats préliminaires de valider leur efficacité *in vivo*.

Les différentes méthodes de raffinement sont respectées. L'hébergement des animaux se fait en confinement adapté en cages individuellement ventilées à raison de 3 à 6 souris par cage. La nourriture et l'eau sont fournies ad libitum. L'environnement est enrichi par ajout de coton et de copeaux compressés utiles à la nidification. Le suivi du développement des pathologies se fera par des mesures cinétiques précoces et prédictives, notamment par le suivi des formules sanguines grâce aux appareils

dédiés à l'hématologie vétérinaire disponibles au sein de l'animalerie, les prélèvements étant réalisés sous anesthésie. Pour s'assurer de leur bien-être, les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne permettant de vérifier les conditions de stabulation et l'état de santé des animaux. 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, avec mise en place si nécessaire d'une analgésie spécifique.

16296 De par la loi, les industriels et les importateurs doivent démontrer qu'ils maîtrisent les risques liés aux substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation (réglementations REACH et CLP). Si des expérimentations s'avèrent nécessaires, elles s'appuient sur les lignes directrices (LD) de l'OCDE.

Cette demande porte sur la réalisation sur 5 ans d'une étude préliminaire, puis de 5 expérimentations suivant la LD n°443 de l'OCDE d'« Etude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération ». L'objectif est d'évaluer la reprotoxicité de substances chimiques et leurs conséquences sur la maturité sexuelle, l'intégrité et le fonctionnement des organes reproducteurs, l'activité comportementale, et les fonctions immunitaires des animaux de la génération F1.

Un nombre total maximum de 1026 rats parents sera utilisé (une étude préliminaire et 5 études complètes). 26 animaux parents seront utilisés pour la réalisation d'une étude préliminaire de validation de la méthodologie, 100 par essai limite et 200 par étude complète (un essai limite ou une étude complète sera réalisé pour chaque substance testée). Au maximum, environ 4100 ratons seront engendrés. Environ 100 ratons seront utilisés pour l'étude préliminaire, 400 par essai limite et 800 par étude complète (en considérant 10 portées pour l'étude préliminaire, 20 pour les essais limites et les études complètes, et 10 ratons par portée).

Compte tenu des données bibliographiques sur chaque substance, des essais limites (un témoin négatif et un groupe traité à au moins 1000 mg/kg de poids corporel/j, n=25 animaux/sexe/groupe) ou des études complètes (un témoin négatif et 3 groupes traités jusqu'à 1000 mg/kg/j, n=25 animaux/sexe/groupe) seront réalisés.

Au sevrage, les animaux de la génération F1 seront répartis dans 3 cohortes pour évaluer les effets de l'exposition aux substances sur la descendance :

- Cohorte 1. Toxicité pour la reproduction et le développement,
- Cohorte 2. Neurotoxicité pour le développement,
- Cohorte 3. Immunotoxicité pour le développement.

Les animaux de la génération parentale (P) seront exposés quotidiennement aux substances d'essai préalablement à l'accouplement, pendant la période d'accouplement, puis au moins jusqu'au sevrage de leur descendance, soit durant 8 à 10 semaines.

La génération F1 sera exposée directement aux substances d'essai du sevrage jusqu'au sacrifice.

Les animaux seront exposés par voie orale. Le mode d'administration, par gavage, via la nourriture ou l'eau de boisson, sera défini en fonction de la substance à tester et de l'objectif de l'étude.

Chaque animal sera observé quotidiennement au plan clinique. Le poids corporel et la consommation alimentaire seront relevés, et un examen clinique détaillé et des frottis vaginaux seront réalisés périodiquement au cours de l'étude. La parturition, lorsqu'elle aura pu être observée, et le comportement maternel des femelles P seront évalués. Les animaux F1 seront sexés (entre la naissance et le 1er jour de vie postnatal [JPN]), leur distance ano-génitale mesurée (JPN0-4), et la persistance du mamelon observée chez les mâles (JPN12-13). Les animaux de la cohorte 2A seront testés au plan de leurs capacités sensori-motrices (JPN3-5 et JPN63-75) et observés à partir de l'âge d'apparition des signes précurseurs de la puberté pour en déterminer le moment. A JPN4, les portées seront ramenées à un nombre maximal de 10 ratons par sacrifice des animaux surnuméraires.

Des analyses d'urine, hématologiques, biochimiques, cytotoxiques, immunologiques et histopathologiques, ainsi qu'une caractérisation du sperme seront réalisés sur des animaux des générations P et F1 (cohorte 1A) à partir d'échantillons d'urine prélevé *in vivo*, de sang prélevé au

moment de la mise à mort, et de spermatozoïdes et d'organes collectés après le sacrifice. A l'autopsie, un examen macroscopique sera pratiqué sur tous les animaux.

Suivant la méthode d'identification choisie (par ex. tatouage), les animaux pourront au préalable être anesthésiés par inhalation d'isoflurane.

Un animal présentant une pathologie pouvant être soulagée pourra recevoir un traitement médicamenteux adapté n'interférant pas avec les objectifs de l'étude (application locale de povidone iodée en cas de lésion cutanée, injection(s) sous-cutanée(s) de buprénorphine en cas de douleur, ou autre traitement recommandé par le vétérinaire référent).

En fin d'étude, ou en cas d'atteinte de points limites nécessitant la mise à mort en cours d'étude, les animaux seront sédatés par inhalation d'isoflurane, puis sacrifiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital, ou, pour les rats adultes et ceux de plus de 10 jours, par inhalation de CO₂, et pour les animaux de moins de 10 jours, par décapitation.

Concernant la réduction, le nombre d'animaux qui sera utilisé suivra les recommandations de la LD de l'OCDE n°443 en considérant un taux d'accouplement réussi d'environ 80%.

Concernant le raffinement, les conditions d'hébergement des animaux seront enrichies pour favoriser leur bien-être. Ils seront hébergés par sexe et par dose à plusieurs par cage pour leur socialisation. Les femelles gestantes seront néanmoins hébergées seules jusqu'au sevrage de leur portée. Un fond sonore sera diffusé pour leur permettre de s'habituer au bruit généré par les manipulations et ainsi limiter le stress. Du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront également disposés dans leurs cages d'hébergement pour favoriser le comportement maternel et le développement cognitif. Préalablement à la collecte d'urine, les animaux seront habitués à la restriction imposée par le placement dans les cages à métabolisme.

Pour ce qui est du remplacement, il n'existe pas actuellement d'alternatives à l'expérimentation animale qui permettent d'évaluer la reprotoxicité sur une génération. Les études *in vivo* sont donc indispensables. Concernant le choix des animaux, le projet suivra les recommandations de la LD de l'OCDE n°443, d'utilisation du rat et de souches communément utilisées en laboratoire.

16297 De par la loi, les industriels et les importateurs doivent démontrer qu'ils maîtrisent les risques liés aux substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation (réglementations REACH et CLP). Si des essais expérimentaux s'avèrent nécessaires, ils s'appuient sur les lignes directrices (LD) de l'OCDE.

Cette demande porte sur la réalisation d'études de toxicité orale aiguë de substances chimiques suivant la LD de l'OCDE n°425. L'objectif de ces études est d'estimer la DL₅₀ de substances, ainsi que leurs éventuels signes de toxicité. Les résultats de ces essais permettront de classer qualitativement et quantitativement des substances dans le Système général harmonisé de classification des produits chimiques entraînant une toxicité aiguë.

La LD prévoit la réalisation de deux types d'études suivant les informations disponibles sur la substance d'essai. Deux procédures expérimentales, correspondant chacune à un type d'étude, sont ainsi décrites dans cette demande. La toxicité de chaque substance sera évaluée par application de la procédure 1 ou 2.

La procédure 1 correspond à la réalisation d'essais limites. Elle consistera en une administration par gavage d'une dose de 2000 mg/kg (ou de 5000 mg/kg si la réglementation l'exige) de la substance d'essai à des rats femelles adultes. La survie des animaux après le traitement sera observée au cours d'une période de temps qui sera définie en fonction des effets de la substance. Dans cette procédure, un maximum de 5 animaux pourra être utilisé par essai, soit un maximum de 50 animaux pour 10 essais limites pour 5 ans.

La procédure 2 correspond à la réalisation des études principales. Elle consistera en une administration de doses prédéfinies de la substance d'essai, par gavage, à des rats femelles adultes. La dose initiale sera déterminée suivant les informations disponibles sur la substance d'essai ou sera par défaut de 175 mg/kg. Les animaux seront traités un par un, suivant un intervalle de temps qui sera défini en fonction des effets observés. La survie de chaque animal conditionnera la dose avec laquelle l'animal

suivant sera traité. Un facteur de progression, qui sera calculé en fonction des informations disponibles sur la pente de la courbe dose-effet de la substance, ou défini par défaut, permettra de déterminer les doses d'essai.

L'étude prendra fin lorsqu'un des critères d'arrêt défini par la LD de l'OCDE n°425 sera observé. La DL50 sera alors calculée par la méthode du maximum de vraisemblance tel que décrit dans la LD.

Dans cette procédure, un maximum de 15 animaux pourra être utilisé par étude, soit un maximum de 150 animaux pour 10 études principales pour 5 ans.

Le projet est envisagé sur une durée de 5 ans avec une prévision de deux études par an, soit d'un maximum de 10 études. En considérant que ces 10 études suivent le schéma expérimental utilisant le plus grand nombre d'animaux, soit 10 études principales utilisant chacune 15 animaux, au maximum 150 rats adultes seront utilisés pour 5 ans.

Les animaux seront observés régulièrement suite au traitement, au moins deux fois dans les heures qui suivront l'administration de la substance pour en évaluer les effets immédiats, puis, à partir du lendemain de l'administration, au moins quotidiennement durant au moins 14 jours. Si la période d'observation est prolongée, un examen clinique détaillé des animaux survivants sera alors également effectué.

Les animaux seront mis à jeun la veille du traitement, et potentiellement jusqu'à quelques heures suite à l'administration de la substance. Ils seront pesés avant le traitement, puis au moins une fois par semaine durant la période d'observation, et au moment de la mort ou du sacrifice.

A l'autopsie, un examen macroscopique sera effectué, et un examen microscopique des organes présentant des anomalies macroscopiques pourra être réalisé.

Suivant la méthode d'identification choisie (par ex. tatouage), les animaux pourront au préalable être anesthésiés par inhalation d'isoflurane.

Un animal présentant une pathologie pouvant être soulagée pourra recevoir un traitement médicamenteux adapté n'interférant pas avec les objectifs de l'étude (application locale de povidone iodée en cas de lésion cutanée, ou autre traitement recommandé par le vétérinaire référent).

En fin d'étude ou en cas d'atteinte de points limites nécessitant la mise à mort, les animaux seront sédatisés par inhalation d'isoflurane, puis sacrifiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital ou par inhalation de CO₂.

Concernant la réduction, le nombre d'animaux qui sera utilisé suivra les recommandations de la LD de l'OCDE n°425.

Au plan du raffinement, les conditions d'hébergement des animaux seront enrichies pour favoriser leur bien-être. Ils seront hébergés dans des cages individuelles, comme préconisé par la LD. Un fond sonore sera diffusé la journée pour leur permettre de s'habituer au bruit généré par les manipulations et ainsi limiter le stress pouvant être ressenti durant les expérimentations. Du matériau leur permettant de nidifier et des bâtons en bois à ronger seront également disposés dans leurs cages d'hébergement pour favoriser leur développement cognitif.

Pour ce qui est du remplacement, il n'existe pas actuellement d'alternatives à l'expérimentation animale qui permettent de déterminer la DL50 de substances suite à une exposition par voie orale. Les études *in vivo* sont donc indispensables. Concernant le choix des animaux, le projet suivra les recommandations de la LD de l'OCDE n°425, d'utilisation du rat femelle à l'âge jeune adulte et de souches communément utilisées en laboratoire.

16298 La survenue, chez certains patients, d'épisodes dépressifs majeurs résistants aux traitements conventionnels, est un problème sociétal majeur. Récemment, l'utilisation de la kétamine - un antagoniste du système glutamatergique - a été approuvée chez l'Homme car elle peut produire des effets antidépresseurs à court-terme chez les patients résistants. Cependant, le mode d'action de la kétamine demeure peu connu, et la réponse peut varier en fonction des patients. De plus, la kétamine peut présenter des effets secondaires tels que l'augmentation de la pression sanguine et des symptômes psychotiques transitoires. Il apparaît donc nécessaire de mettre en place des études permettant de trouver des indicateurs d'une potentielle réponse positive à la kétamine afin de pouvoir

orienter sans risques les patients vers cette stratégie thérapeutique. Notre étude préclinique s'intègre dans ce projet et a pour but, dans un modèle chez le Rat de dépression, de corrélérer la réponse comportementale à la kétamine à la présence de biomarqueurs centraux, i.e., intra-cérébraux (oscillations ou marqueurs de plasticité cérébrale), et périphériques (protéines présentes dans la circulation sanguine). Dans cette optique nous allons utiliser un modèle validé de troubles dépressifs majeurs résistants aux traitements classiques mais répondant positivement à la kétamine, le rat Wistar-Kyoto exposé à un protocole de stress léger chronique. Le rat Wistar sera utilisé comme animal témoin non dépressif. Les biomarqueurs centraux et périphériques seront explorés avant et après l'administration de kétamine, le groupe placebo recevant une solution saline. Ainsi, la comparaison des taux de biomarqueurs avant et après la prise de kétamine, permettra de rendre compte a posteriori de la prédictibilité de ces biomarqueurs en ce qui concerne la réponse positive à la kétamine. L'étude comprendra une première expérience comportementale incluant des enregistrements des activités oscillatoires ainsi que des prélèvements sanguins chez des animaux libres de leurs mouvements, et une deuxième expérience qui comprendra des enregistrements électrophysiologiques *in vitro*.

Cette étude sera effectuée dans le respect de la règle des 3R sur un total de 544 animaux.

Remplacement: il n'est pas possible de se passer de l'animal entier dans des études comportementales, incluant un test d'anhédonie (perte d'intérêt pour la consommation de nourriture plaisante, une solution de saccharose chez le Rat), pour étudier une stratégie thérapeutique dans le cadre de la dépression.

Réduction: tout sera mis en oeuvre pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés; ainsi, nous utiliserons 15 ou 12 animaux par groupe expérimental selon les procédures afin de s'adapter aux contraintes statistiques.

Raffinement: tout sera mis en oeuvre pour limiter la souffrance et l'inconfort des animaux tout au long de ces expériences. Les procédures chirurgicales se feront sous anesthésie générale et analgésie. La température corporelle des animaux sera maintenue pendant toute la durée de la procédure chirurgicale, ainsi que la phase de réveil, grâce à un tapis chauffant thermostaté. Les animaux seront hébergés en groupe dans des cages enrichies avec des éléments en bois à ronger. Leur état général sera régulièrement évalué selon une grille de scoring validée par notre structure du bien être animal; une attention sera plus particulièrement apportée suite de la procédure chirurgicale et suite à la procédure de stress chronique léger, qui comprendra différentes situations, durant chacune de une à quelques heures, telles que l'inclinaison de la cage, un bruit strident, une lumière continue, l'exposition à un congénère, l'exposition à une cage sans sciure, ou avec de la sciure mouillée, une contention; si un animal présentait des signes de mal-être, le vétérinaire référent sera consulté et le ou les médicaments éventuellement prescrits seront administrés; si toutefois l'état de l'animal devait ne pas s'améliorer -selon la grille de suivie des points limites mise en place-, la décision de l'écarter de l'étude serait prise en concertation avec la structure chargée du bien-être animal au laboratoire, afin de soustraire les animaux à cette souffrance.

16299 Les coûts associés au développement de médicaments en oncologie augmentent de manière si importante que les traitements deviennent inaccessibles pour un grand nombre de patients à travers le monde. De plus, la résistance aux traitements est un phénomène courant et un des principaux facteurs de mortalité liés au cancer. Dans ce contexte, des stratégies innovantes, plus efficaces et moins coûteuses sont nécessaires afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'implémenter de nouveaux traitements permettant de surmonter les phénomènes de résistance en clinique. Notre projet est basé sur le repositionnement de médicaments. Cette approche permet l'identification de molécules déjà approuvées par les autorités sanitaires et capables d'augmenter l'efficacité des traitements de référence ou en cours de développement clinique contre le glioblastome (GBM), la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive. Ce projet va ainsi apporter de nouvelles options thérapeutiques dont l'efficacité pourra être évaluée dans le cadre d'essais cliniques. Nous avons criblé *in vitro* une banque de 3700 composés, sur la base de leurs propriétés cytotoxiques, sur plusieurs lignées cellulaires représentatives de la pathologie. Cinq molécules des plus actives (hits) ont ainsi été sélectionnées en fonction de leur spécificité et de leur tolérance.

Ces hits doivent maintenant être validés *in vivo* sur des souris porteuses d'une tumeur de GBM. L'activité antitumorale de chaque hit seul sera évaluée. L'efficacité de traitements à base de combinaisons de hits entre eux ou avec des traitements de référence sera aussi évaluée. Les cellules tumorales seront implantées de façon orthotopique, c'est-à-dire dans le cerveau des animaux afin de mimer au mieux la tumeur humaine. Les différents traitements seront administrés par voie orale. Cette étape de validation *in vivo* est indispensable avant toute utilisation clinique. Ces modèles sont largement décrits dans la littérature. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine.

Nous évaluerons alors l'efficacité des traitements sur les animaux porteurs de tumeurs de GBM, 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. 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. 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 478 souris est prévu pour la globalité de l'étude.

16300 La rétine humaine joue un rôle essentiel dans la vision grâce notamment aux cellules appelées photorécepteurs. Ces cellules fabriquent une matrice qui assure de nombreux rôles essentiels dans la rétine, comme par exemple l'adhésion, la nutrition, la défense et l'activité des photorécepteurs.

Nous avons découvert chez l'Homme que des mutations du gène IMPG1 codant une protéine spécifique de la matrice de ces photorécepteurs étaient responsables de pathologies génétiques pouvant conduire à la cécité.

Un modèle de souris dont le gène IMPG1 a été rendu non fonctionnel, a été généré pour étudier la fonction de cette protéine spécifique dans la rétine. En effet, la réalisation de souris n'exprimant pas cette protéine permettrait de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la maladie et pourrait servir de modèle animal pour le développement de thérapies innovantes.

Nous avons estimé que pour une durée du projet de 5 années, un nombre total de 240 souris serait nécessaire. Afin d'explorer les capacités visuelles des souris nous réaliserons des tests d'exploration fonctionnelle de type "non-invasifs".

Le laboratoire possède une animalerie récente, dans laquelle la température et l'hygrométrie sont contrôlées, les locaux sont en légères sur-pression, les cages possèdent des couvercles filtrants, le suivi quotidien des animaux est assuré par de nombreux zootechniciens, les animaux bénéficient d'un enrichissement du milieu (copeaux, igloos en plastique, bâtonnets de cellulose).

Pour certaine procédure, une anesthésie des souris sera réalisée à l'aide d'un anesthésique général et/ou local et d'une solution oculaire commerciale humaine (permettant la dilatation de la rétine).

16301 Pour traiter les douleurs modérées, les analgésiques les plus utilisés restent les opiacés (morphine, codéine...). Ces composés ciblent principalement le récepteur couplé aux protéines G aux opioïdes mu. Malgré leur efficacité analgésique ils présentent de nombreux effets secondaires indésirables dont le développement de tolérance (disparition de leur activité à la suite de leur administration répétée) et de dépendance. Les composés activant le récepteur aux opioïdes delta (DOR) pourraient constituer une alternative intéressante car ils présentent aussi une activité anti-douleur mais plus spécifiquement dans des modèles de douleurs chroniques. Cependant, leur stimulation répétée conduit à la disparition

encore plus rapide de leur activité. Nous avons identifié récemment une nouvelle famille de protéines adaptatrices des récepteurs aux opiacés dont la protéine GASP1. Notre objectif est d'étudier le rôle potentiel de cette protéine dans la survenue de la tolérance aux agonistes du récepteur DOR dans différents modèles de douleur grâce à des souris chez lesquelles le gène GASP1 a été invalidé et le récepteur DOR étiqueté grâce à une protéine fluorescente verte. Par ailleurs, nous envisageons également de tester des inhibiteurs de l'interaction entre GASP1 et le récepteur DOR pour voir s'ils permettent d'abolir la tolérance aux agonistes de ce récepteur. Ce type de composé pourrait ainsi permettre de maintenir l'efficacité des molécules activant DOR au cours du temps, ouvrant de nouvelles potentialités thérapeutiques pour le traitement des douleurs chroniques.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris car elle est considérée comme un bon modèle pour l'étude de la douleur. Par ailleurs, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'étudier les effets analgésiques de nouvelles molécules.

Raffiner : La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris étant un animal social, les animaux seront maintenus par groupes de 3 à 5, dans des grandes cages enrichies en matériel de nidation. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux. La douleur liée aux administrations est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal pour visualiser tout signe d'inconfort imprévu qui nécessiterait l'arrêt de la procédure expérimentale. Dans les procédures nécessitant une chirurgie, celles-ci seront réalisées sous anesthésie générale avec analgésie adéquate et les animaux seront placés sur une plaque ou sous une lampe chauffante à 37°C jusqu'à leur réveil. Dans les procédures comprenant un modèle de douleur persistante, l'objectif étant d'étudier le rôle de GASP1 dans les effets anti-douleur et la tolérance associée aux composés activant DOR, une analgésie supplémentaire ne pourra être envisagée car elle remettrait en cause les conclusions de l'étude.

Réduire : La réalisation des procédures par un expérimentateur rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré de par notre expérience antérieure que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet d'obtenir des modèles reproductibles avec 10 souris par groupe. Nous envisageons donc l'utilisation de 1622 souris sur une période de 5 ans.

16302 Les cancers de l'ovaire épithéliaux demeurent encore aujourd'hui parmi les plus agressifs, faisant d'eux la cinquième cause de mort par cancer chez les femmes. Dans le but de pouvoir mieux prendre en charge les patientes et de déchiffrer les mécanismes qui gouvernent la progression tumorale et l'échec des traitements, nous cherchons à relier l'élasticité de ces tumeurs aux voies de signalisation identifiées par ailleurs.

L'élastographie permet de mesurer la rigidité des tissus. Ce paramètre est déjà utilisé en routine clinique pour détecter et caractériser l'agressivité des tumeurs du sein. Ce projet étudie l'évolution et l'impact de la rigidité de tumeurs ovariennes humaines, en se basant sur des modèles murins pertinents, i.e. obtenus par greffes - chez la souris- de tumeurs isolées des patientes. Ces modèles (appelés xénogreffes dérivées de Patients) permet de préserver non seulement les cellules tumorales mais également les cellules du micro-environnement tumoral et récapitule bien la pathologie humaine. Les cancers ovariens se distinguent par des profils moléculaires distincts (Stress /Fibrose). Les patientes souffrant de cancers ovariens de type « Fibrose » survivent moins bien que les patientes « Stress ». Les tumeurs xénogreffées présentent des signatures similaires aux signatures moléculaires établies chez les patientes, rendant ces modèles murins précieux pour la compréhension de ces cancers ovariens car récapitulants bien la pathologie humaine. Nous cherchons à comprendre le lien entre les propriétés mécaniques de ces tumeurs et l'activation de certaines voies de signalisation. Ce projet vient en complément d'une précédente étude qui a donné des résultats préliminaires intéressants et qui nécessite des expériences complémentaires. En effet, des résultats préliminaires obtenus démontrent que les cancers ovariens de type « Fibrose » présentent une rigidité augmentant avec la croissance tumorale. La complexité de la formation des tumeurs de l'ovaire et la nécessité d'avoir un

modèle proche de la clinique nécessite d'implanter ces tumeurs sur des souris, pour pouvoir mimer leur développement et suivre les mécanismes moléculaires contribuant à leur rigidité ou non.

Le suivi par élastographie *in vivo* permet un suivi non invasif de la rigidité tumorale. Cette méthode d'examen est pratiquée sous anesthésie générale et est donc sans souffrance ni stress pour l'animal. Les points limites ont également été définis, entraînant la mise à mort anticipée si nécessaire. Les souris sont hébergées dans des cages ventilées, l'eau et la nourriture sont fournies à volonté et le milieu est enrichi par des cotons compactés.

Deux modèles murins distincts seront testés. Le nombre d'animaux nécessaire a été dimensionné plus juste, à partir des tests statistiques employés et de l'expérience obtenue dans les études précédentes. Pour le modèle présentant une signature Stress, 40 souris xenogreffées seront suivies par élastographie et pour le modèle présentant une signature Fibrose, 60 souris xenogreffées seront suivies par élastographie. Au total 100 souris seront utilisées pour ce projet sur 3 ans.

16303 De nombreuses maladies sont causées par la déficience d'une protéine ayant un rôle spécifique. Lorsque cette protéine est en quantité insuffisante, voire absente, des organes ou fonctions vitales sont impactés. Par exemple, les troubles de la coagulation résultent assez couramment d'un manque d'expression d'un facteur de coagulation ou de la production d'une protéine mutante impliquée dans ce processus. Les traitements de ces troubles sont basés sur des stratégies visant à augmenter l'expression du facteur sous-exprimé ou, dans les cas plus graves, l'infusion régulière du facteur de coagulation manquant. Dans le cas de maladies causées par la déficience d'une enzyme (enzymopathies), le traitement repose sur la greffe de moelle osseuse ou l'injection d'enzymes dites 'de remplacement' à vie.

Une autre approche thérapeutique repose sur la thérapie cellulaire, qui utilise des cellules vivantes. Ces cellules peuvent être utilisées comme des usines de production de protéines, afin d'apporter au patient la protéine manquante. Par exemple, on peut envisager de modifier des lymphocytes (un type de globules blancs) présents dans le sang, pour que ces lymphocytes sécrètent la protéine désirée. Une fois modifiés, les lymphocytes peuvent alors être injectés au patient pour produire la protéine thérapeutique.

Les lymphocytes B peuvent générer de grandes quantités d'anticorps protecteurs et continuer à le faire pendant des années, en grande partie grâce à l'activité des cellules plasmiques, qui représentent une sous-population de ces lymphocytes B. Ces cellules ont une longue durée de vie, ne prolifèrent pas, peuvent être isolées de façon non invasive, et possèdent intrinsèquement une activité métabolique importante permettant de générer de grandes quantités de protéines. Ces éléments nous laissent à penser qu'une fois modifiées génétiquement, elles pourraient être une source idéale pour les thérapies de remplacement d'enzyme, ou d'autres types de protéines. Nous avons donc développé nos techniques d'édition du génome pour créer des lymphocytes B capables de sécréter nos protéines d'intérêt à long terme.

Afin de vérifier que les modifications de certains gènes n'altèrent pas la biologie des lymphocytes B, et afin d'obtenir les données précliniques demandées par les autorités sanitaires pour les premiers tests chez l'humain en termes d'innocuité, viabilité et persistance, nous injecterons ces cellules dans un modèle de souris immuno-déficiente, les souris NSG. Dans ces souris, il est possible de reconstituer un système immunitaire humain complet en injectant des cellules souches humaines ou partiel en injectant des lymphocytes T. Ceci permettra de tester l'effet de nos modifications génétiques des cellules B humaines et d'obtenir des données scientifiques dans un contexte le plus proche possible de la situation clinique.

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 de l'acceptation ou du rejet des cellules B éditées. (Raffinement) : Nous veillerons à optimiser les conditions d'hébergement pour limiter l'inconfort des animaux en cas d'apparition d'animaux affaiblis ou montrant des signes d'inflammation et/ou de souffrance. Dans une approche éthique, nous prévoyons de limiter au maximum le nombre d'animaux avec des scores cliniques 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 significatifs. De plus, seuls les lymphocytes B génétiquement modifiés montrant l'activité désirée *in vitro* seront testés *in vivo* afin de réduire le nombre de souris utilisées. Un nombre total de 585 souris sera nécessaire.

16304 Le système nerveux central est composé d'un réseau complexe de synapses. Ce réseau est responsable de l'activité cérébrale ainsi que de la transmission d'information. En condition pathologique, la décharge de beaucoup de neurones du réseau en même temps correspond à une crise épileptique. L'épilepsie est une maladie neurologique qui cause des crises spontanées et répétées dues à la prédisposition d'une communication aberrante entre les neurones. Il existe plusieurs facteurs (par ex. génétiques, traumatiques ou infectieux) qui contribuent à la mise en place de cette prédisposition ; cette mise en place se fait pendant l'épileptogénèse.

Aujourd'hui, il n'existe pas de remède pour l'épilepsie. On peut seulement contrôler les symptômes, les crises, grâce à des médicaments antiépileptiques. De plus, d'autres maladies peuvent coexister avec l'épilepsie à cause du changement du réseau neuronal : les comorbidités. Celles-ci peuvent être des pathologies psychiatriques (dépression, anxiété, troubles de l'attention...), cognitives mais aussi inflammatoires. Les comorbidités vont alors influencer le choix de traitement à donner pour éviter les effets négatifs et l'aggravation des symptômes.

Nous proposons d'étudier une nouvelle cible potentielle qui pourrait atténuer les symptômes comportementaux associés à l'épilepsie. Il s'agit d'un récepteur au glutamate, nommé mGlu7, fortement exprimé dans le cerveau et dont l'activation diminue l'activité neuronale aberrante liée à l'épilepsie. Nous utiliserons un modèle d'épilepsie induit chez la souris. Différents tests comportementaux non invasifs seront mis en place pour mesurer plusieurs facteurs (anxiété, motricité, mémoire, apprentissage, sociabilité...) suite au traitement des animaux avec une molécule capable d'activer mGlu7. Ce composé a déjà montré des propriétés protectrices contre la progression de l'épileptogénèse et sera utilisée pour vérifier si elle protège aussi contre les comorbidités.

Conformément à la règle des 3R, le nombre d'animaux nécessaire au projet sera réduit au maximum grâce à une approche rationnelle. Dix animaux seront utilisés pour chaque condition, pour un total de 336 souris.

Afin de remplacer là où possible l'utilisation d'animaux, toutes les mesures d'activité des composés utilisés dans l'étude ont été réalisées sur des systèmes de culture cellulaire.

Une importance toute particulière sera portée sur la gestion de la douleur, de l'angoisse et de la souffrance des animaux pouvant subvenir au cours des différentes procédures expérimentales. Pour ce faire, une anesthésie générale sera effectuée pendant l'entièreté de la chirurgie stéréotaxique. 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. Les animaux seront maintenus dans un environnement enrichi et répondant aux normes de la directive européenne de 2010. Les animaux seront donc hébergés dans des compartiments adéquats pour leur permettre de sauter et de se tenir debout. La nourriture et l'eau seront disponible à tout moment de la journée, sauf lors d'un test particulier impliquant une restriction alimentaire. Enfin, pour éviter de stresser les animaux, les compartiments seront isolés de tout bruit extérieur et suivront un cycle naturel de jour/nuit. Les litières seront changées chaque semaine. Les souris seront également suivies par du personnel formé et compétant, pour leur bien-être durant toute la durée du projet.

16305 Les carcinomes de la glande mammaire sont des cancers du sein d'origine épithéliale et sont la première cause des décès liés au cancer dans le monde occidental chez la femme. Les cellules de carcinomes mammaires possèdent un grand potentiel à envahir et à coloniser des organes secondaires tels que les poumons ou le cerveau. Dans ce cancer particulièrement, mais également dans de nombreux autres carcinomes, le microenvironnement tumoral joue un rôle crucial au cours de leur développement. Récemment, un nouvel élément du microenvironnement tumoral a été identifié : les prolongements des neurones (axones) du système nerveux périphérique. S'il est maintenant clairement

établi que certaines cellules du microenvironnement influencent la tumorigenèse et la progression tumorale, le rôle des cellules nerveuses et notamment des fibres nerveuses infiltrant les tumeurs reste mal compris. Nous proposons donc d'étudier l'influence du système nerveux et plus particulièrement de l'axonogenèse (innervation des tumeurs) dans le développement des carcinomes mammaires chez un modèle de souris génétiquement modifié. Ce projet explore donc une nouvelle voie afin de lutter contre la progression tumorale.

Les différentes procédures utilisées dans ce projet nous permettront :

1/ de décrire l'innervation des tumeurs

2/ d'identifier les molécules impliquées dans le lien entre projections nerveuses et les tumeurs

La description de cette innervation, son rôle dans le développement tumoral et les mécanismes impliqués pourraient à terme permettre d'identifier des indicateurs aidant aux pronostics pour les patients. Cette étude permettra également d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de mettre au point de nouveaux traitements.

Notre projet nécessite l'utilisation de 600 souris, en accord avec la règle des 3Rs :

Réduction :

Nous procéderons à une utilisation maximale des données obtenues sur chaque animal et nous combinerons les différents marqueurs utilisés dès que cela sera possible. De plus, les croisements permettront d'obtenir à la fois les individus contrôles et mutants dans le but de limiter le nombre de croisements entre les animaux.

Nous utiliserons des outils statistiques en ligne (biostatgv.sentiweb.fr) afin de calculer le nombre de souris nécessaire pour nos expérimentations (décrit dans point 3.3.5).

Remplacement : La culture de cellules tumorales primaires humaines ou la co-culture avec d'autres types cellulaires ont été développées au laboratoire. Ces méthodes alternatives nous permettent d'obtenir des résultats complémentaires aux animaux pour notre étude et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Cependant, l'utilisation de modèles murins est essentielle et unique pour notre étude qui vise à comprendre, de façon intégrative, les effets d'une pathologie invasive dans tout l'organisme, ainsi que les mécanismes sous jacents à son initiation.

Raffinement : Nous utiliserons un modèle de souris transgénique où un gène favorisant le développement des tumeurs est exprimé spécifiquement dans le tissu mammaire. Ce modèle est un outil puissant, bien développé et couramment utilisé dans l'étude des carcinomes mammaires par sa capacité à reproduire les différentes étapes de développement du cancer (Lin et al., Am J Pathol 2003). Afin de réduire la douleur, la souffrance et/ou l'inconfort potentiellement ressentis par l'animal lors de nos expériences mais aussi d'obtenir des résultats les plus reproductibles possible, les animaux seront placés dans un environnement enrichi avec un suivi hebdomadaire de paramètres bien définis pour le modèle utilisé (poids, comportement, aspect général, aspect et évolution de la tumeur...). En effet, toute variation des conditions d'hébergement liée aux paramètres environnementaux et sanitaires peut influencer le bien-être de l'animal et ainsi engendrer des pertes ou une mauvaise reproductibilité. Nous contrôlerons les paramètres environnementaux en respectant les conditions d'hébergement suivant : 4 souris par cage enrichie par une mouse house en polycarbonate rouge autoclavable, 2 buchettes en bois et des cylindres de coton. Nous contrôlerons le statut sanitaire des souris qui seront hébergées dans une zone transgénique agréée, avec stabulations en portoirs statiques à glissière ou portoirs ventilés, recouverts de couvercles filtrants et change sous hotte. Cette zone a un statut sanitaire contrôlé répondant aux normes FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations). Ainsi, nous pourrions réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement valables. L'évaluation du bien-être de l'animal se fera grâce à des fiches d'évaluation décrivant, spécifiquement pour le modèle utilisé, les points limites suffisamment prédictifs, précoces et précis, afin de détecter tout signe de douleur et/ou de souffrance, et ainsi agir par des actions dans le respect de la règle des 3Rs.

Le suivi des animaux sera réalisé de façon hebdomadaire pour les souris ayant des tumeurs peu avancées. Nous passerons à un suivi 3 fois par semaine pour les souris ayant des tumeurs aux stades plus avancés.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats scientifiques valables nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés, le bien être animal et de suivre la règle des 3Rs. Ainsi ce projet utilisera 600 souris.

Notre étude permettra une meilleure compréhension du carcinome de la glande mammaire et apportera des outils pour un diagnostic précoce et une meilleure prise en charge des patients atteints de ce cancer.

16306 Les interférons sont des protéines de la famille des cytokines produites par la plupart des cellules en réponse à des agents pathogènes, principalement les virus. Si le rôle protecteur antiviral des interférons est parfaitement caractérisé, les effets dans d'autres contextes immunitaires (réponses aux bactéries, parasites, cellules tumorales, etc..) restent incertains voir opposés selon le pathogène ou l'organisme concerné.

Les effets contrastés -protecteurs ou néfastes - des interférons sont notamment bien illustrés lors de la dérégulation du système immunitaire. C'est le cas des maladies autoimmunes (où le système immunitaire s'attaque aux constituants normaux de l'organisme), des maladies autoinflammatoires (où la réaction inflammatoire est activée de façon inadéquate) ou lors des « orage de cytokines » (où la réaction de défense immunitaire devient néfaste et crée des lésions).

Ces dérégulations du système immunitaire sont l'objet d'étude du laboratoire et nous cherchons à identifier le rôle, protecteur ou néfaste, des interférons dans ces différents contextes. Pour répondre à cette question, des souris génétiquement modifiées, dont la production ou la réponse aux interférons est modifiée, sont utilisées.

Le but de ce projet qui utilisera 69 animaux (souris) est de décrire le maintien des lignées génétiquement modifiées au laboratoire, en respectant au maximum la règle des 3 R :

Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire a été estimé au minimum mais néanmoins suffisant et Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires.

Raffiner: Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et des points limites spécifiques ont été déterminés pour éviter toute souffrance animale et justifier un arrêt de l'expérience en cours. Les procédures sont réalisées au maximum sous anesthésie ou après sacrifice et le suivi des animaux par du personnel formé est quotidien, weekend et jours fériés inclus. Les souris sont maintenues en groupe de 2-3 par cage pour maintenir une interaction entre individus et l'environnement des cages est enrichi à l'aide d'un tuyau, de copeaux dans les litières et de fibres de coton pour la construction des nids; les souris ont accès ad libitum à la nourriture et à de l'eau.

Remplacement: Les données dans la littérature antérieure sur des modèles *in vitro* et des études cliniques humaines n'ont pas permis d'élucider clairement à ce jour le rôle des interférons dans les dysfonctions immunitaires. Seul le modèle animal permettra dans notre cas de répondre à ces questions complexes.

16307 La migraine est un désordre neurovasculaire caractérisé par des crises récurrentes de céphalées accompagnées de troubles neurologiques variables dont l'allodynie cutanée céphalique (sensation douloureuse au toucher léger). Ce symptôme est le plus fréquent chez les patients atteints de migraine. Il affecte 60 à 80% des patients souffrant de migraine chronique. De plus, l'apparition de l'allodynie est considérée comme un facteur de risque de chronicisation de la migraine.

De plus les données expérimentales récentes animales et humaines placent le CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) au cœur des mécanismes physiopathologiques de la migraine chronique et de ce fait il constitue un marqueur neurochimique reconnu.

Les traitements antalgiques de la migraine chronique restent encore de nos jours insuffisants voire inefficaces. Deux types de traitements sont disponibles : (i) les traitements de crise, incluant notamment

les triptans, qui ont pour objectif de diminuer l'intensité et la durée de la crise ; (ii) les traitements de fond qui sont pris en continu et visent à réduire la fréquence des crises en rendant les migraineux moins sensibles aux facteurs déclenchants. Cependant, ces molécules ont une efficacité limitée et certaines d'entre elles provoquent des effets indésirables importants. D'autres cibles moléculaires peuvent cependant être envisagées avec en particulier les inhibiteurs d'enképhalinases (IENk) bloquent la dégradation des opioïdes endogènes. Ces composés constituent un nouvel espoir dans le traitement de la migraine car, en plus d'être dénués des effets secondaires des opioïdes, des travaux préliminaires ont montré une activité antalgique dans un modèle de migraine par donneur de NO chez le rat. Ce modèle, utilisé dans ce projet, permet de mesurer une allodynie mécanique céphalique persistante (chronique) après l'injection répétée systémique (1 injection / jour/ 5 jours) intrapéritonéale d'ISDN, un donneur de NO (monoxyde d'azote) connu chez l'homme pour déclencher des crises de migraine.

Durant ce projet, nous mesurerons après chaque injection la sensibilité cutanée par l'application mécanique de filaments de von Frey permettant de détecter un seuil (en g) de retrait facial et donc une allodynie en cas de baisse de ce seuil, et ainsi s'assurer de l'efficacité de l'ISDN dans les conditions de l'expérience.

Le but final de ce travail est de mesurer au 5ème jour (après mesure du seuil et mise à mort de l'animal) sur tissu cérébral (ganglion et noyau trigéminal), via une approche immunohistochimique par Western Blot, le taux d'expression de CGRPs induite par l'ISDN répété. Afin de montrer le potentiel antalgique (anti allodynie) de l'IENk, l'analyse immunohistochimique portera sur 3 groupes de 6 animaux ainsi constitués : un groupe témoin sera composé d'animaux recevant 10 minutes avant chaque injection systémique d'ISDN un pré-traitement oral d'IENk ; un groupe témoin négatif sera constitué de rats recevant un pré-traitement oral de sérum physiologique et un groupe témoin positif recevra un pré-traitement oral de propranolol (traitement prophylactique de référence).

Les résultats attendus sont : une forte expression tissulaire de CGRP dans le cas témoin négatif qui sera significativement diminuée par comparaison dans le cas du traitement IENk qui lui sera comparable ou supérieur à celui du propranolol, et ainsi apporter une preuve de plus dans l'efficacité antalgique de l'IENk dans ce modèle de migraine par donneur de NO.

Afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats (18 au total) pour 3 groupes de 6 animaux tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si la distribution est normale ou un test non paramétrique dans le cas contraire). Le recours à l'animal vivant pour le projet est justifié par le fait que l'étude des effets antalgiques de l'agent pharmacologique ne peut être réalisé que sur un animal conscient. Sachant que cette étude, du fait même de sa nature (étude douleur), ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions injections répétées (5 jours), toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, la perte de poids >15%, l'impossibilité à se mouvoir, des relations sociales... mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection létale d'anesthésique.

16308 L'obésité, qualifiée d'épidémie depuis 1997 par l'OMS, touche plus de 1,9 milliards d'adulte dans le monde. De plus, l'OMS prévoit qu'un quart de la population mondiale sera obèse d'ici 2045. L'obésité se caractérise par une surcharge pondérale et favorise le développement de nombreuses complications, dont la dyslipidémie, l'insulino-résistance, la stéatose hépatique qui impliquent le dysfonctionnement de nombreux organes, tels que le foie et le tissu adipeux.

Dans ce contexte, contrairement aux effets délétères associés à une augmentation de la production de glucose par le foie, la production intestinale de glucose (PIG) est une fonction particulièrement intéressante, puisqu'elle contrôle positivement le métabolisme. En effet, le glucose produit par l'intestin active un signal nerveux trouvant son origine dans la zone hépato-portale ("signal glucose portal") qui

se traduit, au niveau central, par une induction de la satiété, une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la production de glucose par le foie.

Le rôle important de la PIG dans la régulation du métabolisme a été démontré grâce à la caractérisation du phénotype de deux modèles murins : d'inactivation ou d'induction de la PIG. Ainsi, les résultats montrent que la PIG est capable de favoriser ou de protéger de l'apparition de nombreux troubles métaboliques tels que l'obésité, le diabète, la stéatose hépatique ou encore la dyslipidémie.

Plus particulièrement, ces études ont permis de mettre en évidence le rôle de la PIG dans la régulation du métabolisme du tissu adipeux, et notamment sur sa fonction de production de chaleur (thermogenèse) qui est un poste de dépense d'énergie important dans la résistance au froid, mais également dans le maintien de la balance énergétique. En effet, de nombreuses études visent à augmenter la dépense d'énergie en modulant la thermogenèse du tissu adipeux, dont on sait qu'elle est diminuée au cours de l'obésité.

Puisque cette fonction est principalement sous le contrôle du système nerveux sympathique (SNS), cette étude vise à déterminer si les effets de la PIG sur le métabolisme du tissu adipeux passent une activation du SNS et préciser les mécanismes impliqués.

Cette étude est réalisée dans différentes conditions nutritionnelles afin de nous d'étudier les effets métaboliques de la PIG dans un état physiologique (régime standard) et pathologique (régime hypercalorique riche en gras et en sucre).

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) :

Remplacement : Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux puisque la fonction étudiée, la production de glucose par l'intestin, a des impacts sur l'ensemble du métabolisme de l'organisme et implique des dialogues entre organes. En effet, le glucose produit par l'intestin est détecté au niveau des senseurs de glucose dans les vaisseaux qui vont transmettre un signal nerveux au niveau du cerveau. En réponse, le cerveau va émettre des signaux nerveux en périphérie, régulant en particulier le métabolisme du 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 120 souris mâles transgéniques et contrôles.

Raffinement : Les souris seront élevées et hébergées par groupe 3-4 souris par cage en milieu enrichi pour favoriser la nidation (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé. 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.

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.

16309 Les événements stressants de vie sensibilisent certains individus à développer une dépression. Le projet, qui répond à un enjeu sociétal majeur, vise à rechercher des biomarqueurs permettant d'identifier cette population à risque de développer une pathologie dépressive.

Le modèle de stress utilisé inclut la défaite sociale, éthique et éthologique basée sur la perte du statut social.

Le projet vise à la fois à étendre l'identification de nouveaux biomarqueurs et à déterminer les mécanismes responsables de la sensibilisation à la dépression. Certains animaux seront appareillés afin d'évaluer par électroencéphalogramme (EEG) l'effet du stress sur le sommeil et d'autres verront leur flore intestinale modifiée expérimentalement pour évaluer l'effet sur le microbiote.

Le nombre d'animaux nécessaires pour mener à bien ces expériences est évalué à 925 rats. Ce projet a été établi en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner »:

- Les mesures de raffinement vont consister en l'application de mesures antalgiques appropriées et un suivi des points limites permettant de soulager les animaux si nécessaires.

- Le nombre de rats a été réduit pour obtenir une validation statistique en réalisant les tests comportementaux sur l'ensemble des animaux des différents groupes.

- L'étude a été raffinée en développant un suivi rigoureux des rats tout au long du protocole en les pesant, observant et manipulant quotidiennement la semaine.

A noter que dans les travaux publiés précédemment avec ce protocole, aucune souffrance ou mortalité de rat n'est mentionnée.

- L'utilisation de ce modèle *in vivo* est indispensable à la caractérisation de marqueurs de l'état de vulnérabilité à la dépression. Les différentes voies de signalisation mises en évidence *in vivo* seront, par la suite, examinées *in vitro*.

Ce travail permettra de proposer de nouveaux biomarqueurs qui feront l'objet d'études cliniques, grâce aux collaborations que nous entretenons avec les cliniciens.

16310 La leucémie aiguë lymphoblastique à cellules T (LAL-T) est une leucémie agressive du sujet jeune. La mortalité est essentiellement liée aux rechutes qui sont constamment fatales. Il convient donc de développer de nouvelles approches thérapeutiques afin d'améliorer le pronostic de cette maladie.

Nos données montrent l'intérêt, pour le traitement des LAL-T, d'une immunothérapie déjà utilisée en clinique dans d'autres maladies. L'effet de l'immunothérapie dépend de l'environnement des cellules leucémiques dans l'organisme hôte. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité du traitement *in vivo* pour bénéficier de l'effet de l'environnement immédiat sur ces cellules.

Plus précisément, les objectifs du projet consistent à évaluer l'efficacité de l'immunothérapie multispécifique (IM) et à différencier éventuellement un sous type moléculaire de LAL T plus sensible. Ces objectifs nécessitent une étude de survie et de tolérance qui ne peut être menée que sur un modèle *in vivo*. En effet l'effet de l'IM est largement médié par différents types cellulaires, notamment des cellules inflammatoires contenues dans la rate. Il est donc impossible de reproduire l'environnement immunitaire *in vitro* et l'étude *in vivo* apparaît indispensable.

Dans cette étude, nous voulons apporter la preuve de l'efficacité thérapeutique de l'immunothérapie. Ce traitement étant utilisé par ailleurs en hématologie, nous en connaissons les effets secondaires dominés par une importante baisse des lymphocytes T. Nous injecterons sous anesthésie générale des cellules leucémiques de patients à des souris dont le système immunitaire est affaibli, pour permettre le développement de la leucémie. Nous injecterons ensuite l'IM par voie veineuse pour observer les effets sur le développement et la disparition de la leucémie. Les souris utilisées n'ont pas de lymphocytes T. L'IM entraînant une baisse des lymphocytes T ne devrait par conséquent présenter que très peu d'effets secondaires.

Afin de préserver le bien-être animal, Le suivi des animaux sera réalisé de manière quotidienne par le personnel de l'animalerie. 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. Les expérimentateurs réaliseront le scoring des signes cliniques de manière bi-hebdomadaire, en observant l'état général des animaux (activité de jeu, sociabilité, activité spontanée et stimulée, signes d'anémie) et en anticipant les signes cliniques par une ponction veineuse régulière initialement mensuelle, dont la fréquence sera ajustée en fonction du taux de cellules leucémiques détectées. Des points limites ont également été définis.

Nous testerons l'efficacité de l'IM selon un modèle préventif (administration du médicament avant l'apparition de la leucémie) et curatif (administration du médicament après l'apparition de la leucémie). Nous testerons au total 11 leucémies pour couvrir l'hétérogénéité des LAL-T. Au total, nous estimons par conséquent le besoin en animaux à 475 sur une durée totale de 5 ans pour garantir l'obtention de résultats scientifiques statistiquement significatifs.

Certains tests mécanistiques pourront être réalisés in-vitro à partir des cellules obtenues à la suite de ces expériences in-vivo, ce qui permet de réduire le nombre de souris total nécessaire.

16311 Les leucémies aiguës représentent environ 1% des cancers, soit 3 250 nouveaux diagnostics en 2012 en France (Santé Publique France). Les traitements actuels reposent sur la chimiothérapie en association avec la greffe de moelle mais le pronostic global reste médiocre (survie à 5 ans : 5 à 40%)

en raison de la fréquence élevée des rechutes. Ces rechutes sont causées par la persistance des cellules souches leucémiques (CSL) insensibles aux thérapies actuelles. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc un enjeu majeur dans cette pathologie. Ce projet scientifique vise à évaluer l'efficacité *in vivo* de deux nouveaux médicaments. Ces médicaments ont déjà été testés *in vitro* sur des cellules leucémiques de patients et ont montré une très bonne efficacité. Les cellules de patients ne pouvant être maintenues en culture que quelques jours, il est nécessaire de les greffer dans des souris immunodéprimées afin d'évaluer l'efficacité *in vivo* de ces médicaments. Il n'est donc pas possible de mettre en place des méthodes de substitutions qui évitent l'emploi d'animaux vivants. Pour le premier médicament nous utiliserons un modèle où les souris recevront une greffe de cellules tumorales issues de la moelle osseuse de patients leucémiques par injection intraveineuse. Le second médicament sera testé sur un modèle où les souris recevront par voie sous-cutanée des cellules de lignées leucémiques humaines. Nous étudierons aussi pour ce médicament sa toxicologie et sa pharmacocinétique par injection intra-péritonéale ou intra-veineuse puis en réalisant des prélèvements sanguins.

Les souris seront surveillées de façon quotidienne et si l'un des points limites est atteint il y aura une mise à mort anticipée de l'animal. Des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à la disposition des souris : cotons, maisonnettes en carton et bâtonnets à ronger.

Ce projet a été élaboré selon la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés à chaque procédure est nécessaire étant donné la variabilité de la prise de greffe d'une souris à l'autre. Il est suffisant pour exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats de l'expérience et permet de réaliser une analyse statistique fiable.

Ce projet qui nécessitera d'utiliser 810 souris au maximum sur une période de 3 ans nous permettra d'évaluer l'efficacité, la pharmacocinétique et la toxicité *in vivo* de nouvelles cibles thérapeutiques dans la leucémie aiguë.

16312 Les coccidies sont des protozoaires parasites naturels des oiseaux sauvages et domestiques. En conditions d'élevage, elles posent des problèmes sanitaires et économiques chez les volailles. Les approches prophylactiques par usage d'anticoccidiens ont contribué à l'émergence de résistance dans les populations de coccidies, affaiblissant l'intérêt et l'efficacité de ces molécules. Selon la recommandation de la Commission de l'UE, le développement et l'évaluation d'alternatives aux méthodes existantes est nécessaire.

Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité de produits à base d'huiles essentielles et d'extraits de végétaux sur un modèle expérimental permettant de reproduire une coccidiose chez le poulet conforme à ce qui peut être observé en élevage commercial. L'impact principal d'une infestation modérée est une baisse de croissance des oiseaux observables uniquement sur l'animal lui-même, sans impact majeur sur le bien-être des animaux

Pour cette étude de 2 ans, deux essais de 35j avec 720 (1440) poulets sont prévus. Les poulets sont élevés de 0 à 35j dans des modules de 0.84m². Jusqu'à 21j, il y a au maximum 5 poulets par modules, puis de 21 à 35j ils sont au maximum 4 poulets par module. Sur les 1440 poulet seuls 1080(540x2) recevront nombre faible d'oocystes afin d'induire une infestation légère. Le nombre de répétition et de poulets par groupe a été choisi pour être en mesure d'observer des différences statistiques sur leur croissance. Les performances des groupes (consommation, poids des animaux, etc.) seront comparées à l'aide d'ANOVA avec poids à 10j en covariable

Les expérimentations sont conçues en respectant la règle des 3Rs:

-Remplacer: Des méthodes *in vitro* existent pour évaluer l'activité anticoccidienne directe, comme celle des additifs anticoccidiens, elles ne sont cependant pas adaptées pour tester des extraits naturels qui agissent sur la stabilité de la muqueuse digestive et l'équilibre de la microflore intestinale.

-Réduire: Ce dispositif permet d'observer des différences statistiques entre les solutions techniques testées avec un minimum d'animaux (plus petite différence significative de 2% sur l'indice de consommation)

-Raffiner: Une attention particulière est portée au suivi des animaux (passage d'animalier minimum 2 fois/jour) et l'environnement est maîtrisé. Les manipulations sont réduites au minimum afin de limiter le

stress des animaux. De plus, afin de garantir le bien-être des animaux, l'inoculation est réalisée par du personnel habitué à la manipulation. Seuls 2 tentatives seront réalisées. Suite à l'inoculation si des désordres de santé sont observés (ex : boiterie ou diarrhée sévère) l'animal sera euthanasié.

16313 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte de neurones au niveau du système nerveux central (localisés dans le cerveau) et périphérique (localisés dans le tronc cérébral et la moëlle épinière). Cette perte de neurones entraîne une atrophie musculaire et une paralysie progressive menant, dans les 3 à 5 ans qui suivent le diagnostic, au décès du patient par paralysie des muscles respiratoires.

De nombreuses mutations responsables de la maladie ont été identifiées. Parmi ces mutations, on trouve une mutation de l'enzyme superoxyde dismutase 1 (SOD1). Afin d'étudier la progression de la maladie, des modèles murins transgéniques ont été générés, en incorporant par exemple dans le génome d'une souris le gène humain SOD1, porteur de mutations SOD1 identiques à celles retrouvées dans des cas de SLA.

L'objectif de ce projet est d'étudier les modifications des neurones dans le système nerveux central (au niveau du cortex moteur) des souris transgéniques SOD1 afin de comprendre les mécanismes à l'origine de la SLA, puis de tester l'efficacité / toxicité de molécules en développement. Pour cela, nous utiliserons la technique d'électrophysiologie ex-vivo, sur coupes cérébrales.

Ce projet, d'une durée de 5 ans, nécessitera 400 souris.

Avantages : Ce projet scientifique associé à notre plateforme d'électrophysiologie ex-vivo (sur coupes cérébrales) permettra de mettre en évidence 1) les modifications de fonctionnement des neurones du cortex moteur associés à des modèles de la SLA et 2) de tester les effets neurotoxiques / neuroprotecteurs de molécules en développement sur ces modifications. Ces 2 analyses seront réalisées à l'aide de la technique d'électrophysiologie *ex vivo*, c'est-à-dire sur coupes cérébrales. Les molécules à tester seront appliquées directement sur les coupes cérébrales. L'électrophysiologie est une technique très puissante qui permet l'enregistrement de l'activité électrique à l'échelle d'un réseau de neurones ou de neurones isolés.

Domages escomptés : Les modèles de souris transgéniques que nous utiliserons présentent un phénotype dommageable et des signes pathologiques qui miment la pathologie humaine avec une dégénérescence progressive des neurones entraînant un déficit moteur puis la mort des animaux. Leur bien-être sera attentivement suivi durant toute la durée du projet grâce à des fiches d'observation/points limites adaptés aux modèles. Des procédures de prise en charge adaptées seront également mises en place. Des points limites préalablement définis 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.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) : L'étude du système nerveux, de par 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 neurodégénératives. Pour ce projet, nous utiliserons des souris qui ont été génétiquement modifiées et qui sont commercialisées en tant que modèles reconnus de la SLA. Ces modèles sont largement utilisés par la communauté scientifique nationale et internationale pour la recherche fondamentale et l'étude de l'effet de molécules sur les modèles de SLA.

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 des coupes cérébrales issues d'un même animal, nous pourrions enregistrer simultanément différents paramètres électrophysiologiques. L'évaluation du nombre d'animaux nécessaire ainsi que l'analyse des résultats seront effectuées à l'aide de logiciels spécialisés. Nous adapterons les tests statistiques en fonction de la distribution des observables, qu'elle soit normale ou non.

-raffinement : 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...). Nous réduisons le stress procuré à l'animal en limitant au maximum le bruit dans l'animalerie et en les manipulant avec calme et soin. Boisson et nourriture seront disponibles ad libitum. Avant les expériences, les animaux seront acclimatés pendant une période d'au moins 5 jours. Une observation journalière des animaux sera mise en place dès l'expression du phénotype dommageable, qui apparaît vers 12 semaines. Les animaux seront utilisés avant l'âge de 14 semaines, âge auquel l'état de santé devient critique. Des points limites préalablement définis permettront d'assurer un suivi de l'état général des animaux et de leur bien-être (souffrance, stress, angoisse). En cas d'altération de l'état de l'animal, la surveillance sera rapprochée et les animaux seront pris en charge en fonction de la sévérité de la douleur observée.

16314 Les hémoglobinopathies regroupent l'ensemble des pathologies liées à une anomalie génétique de l'hémoglobine, protéine sanguine servant à transporter l'oxygène et présente dans les globules rouges (érythrocytes). Ce projet vise à caractériser les mécanismes impliqués dans les lésions de la bêta-thalassémie et la drépanocytose.

La drépanocytose et la bêta-thalassémie sont des maladies génétiques qui représentent un problème de santé publique majeur reconnu par l'OMS.

Dans ces maladies, le patient est atteint d'une anémie sévère, nécessitant des transfusions sanguines fréquentes. Cela a des conséquences importantes sur le développement de l'individu et sur sa qualité de vie.

L'anémie étant une manifestation systémique et d'étiologie différente selon chaque maladie, seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible les anomalies génétiques de l'hémoglobine et le microenvironnement immunitaire permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans ces maladies et de développer des nouvelles thérapies pour le traitement de l'anémie et les complications secondaires observées dans la bêta-thalassémie et drépanocytose. Les cibles thérapeutiques ont été préalablement identifiées par des études *in vitro*, mais il est indispensable d'évaluer leur efficacité dans des organismes vivants. La souris est le modèle animal le plus probant. Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes impliqués dans l'anémie et les lésions vasculaires au cours de la drépanocytose et la bêta-thalassémie.

Dans ce projet, nous testerons l'efficacité des traitements modulateurs de l'immunité innée selon un modèle préventif (administration du médicament avant l'induction de la crise vaso-occlusive) dans un modèle de drépanocytose. Nous proposons également des traitements chroniques capables d'améliorer l'érythropoïèse et l'expression de l'hémoglobine fœtale dans les modèles de drépanocytose et bêta-thalassémie.

Ce projet sur 5 ans utilisera 645 souris. Toutefois 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 les effets sur la réponse inflammatoire et l'érythropoïèse nécessitent l'utilisation d'un modèle animal.

2) Réduction : avec l'aide de l'assistant de conception expérimentale (NC3RS) nous utiliserons le nombre minimum d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet (également confirmés par un calcul basé sur la puissance statistique avec le logiciel invivostat).

3) Raffinement : une surveillance quotidienne sera effectuée auprès des animaux afin de s'assurer de leur bien-être constant. Les épisodes de vaso-occlusion induits se dérouleront sur effet analgésique de type morphinique (Buprénorphine), afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux. Pendant l'élevage, les animaux pourront bénéficier de soins médicaux le cas échéant, sur avis vétérinaire (analgésiques, etc.). Si les points limites décrits dans ce projet sont atteints, nous choisirons en dernier recours l'euthanasie de l'animal. Les animaux bénéficieront d'un programme d'enrichissement, comme des carrés de cellulose ou une maisonnette en carton, défini par la cellule de l'établissement chargée de leur bien-être.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. La perte de poids et le comportement de l'animal seront suivis régulièrement. L'observation des cinq expressions faciales de l'échelle de douleur chez la souris (Mouse Grimace Scale d'après Langford et al., 2010) nous aidera pour l'évaluation de la présence de douleur chez les souris en expérimentation.

À la fin de chaque procédure, les animaux seront euthanasiés selon les méthodes autorisées dans l'annexe IV de l'arrêté relatif à l'agrément des établissements du 1er février 2013.

À terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans l'anémie et le développement des lésions microvasculaires au cours de la drépanocytose et la beta-thalassémie. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en cause, permettant ainsi de proposer aux patients atteints de ces maladies génétiques de l'hémoglobine des traitements autres que la transfusion chronique de sang.

16315 Le développement de cancer fait intervenir de nombreux facteurs, l'un d'eux est dysfonctionnement du système immunitaire qui n'est plus capable de reconnaître et détruire les cellules cancéreuses. Des cellules régulatrices impliquées dans la tolérance périphérique sont aussi impliquées et empêchent le système immunitaire de s'activer contre les cellules tumorales.

L'objectif de ce projet est d'étudier la contribution de l'interleukine-34 (IL-34) dans la réponse anti-tumorale grâce au modèle tumoral C6 chez le rat Sprague Dawley WT ou déficients en IL-34. L'IL-34 est une cytokine immuno-régulatrice dont l'implication dans la tumorigénicité a été mis en évidence. Des études menées par notre équipe ont mis en évidence que l'IL-34 est une cytokine exprimée par les cellules T régulatrices CD4+ et CD8+ et permet d'induire une tolérance à l'allogreffe. De plus, cette cytokine régulatrice est aussi nécessaire au recrutement et développement de macrophages régulateurs qui dans le cas de cancer semblent être pro-tumorigénique. L'injection de cellules tumorales en sous cutanée chez les rats déficients en IL-34 vs rats WT permettra de définir le rôle d'IL-34 par suivi de la pousse tumorale et de répondre à la question suivante; est-ce que l'IL-34 joue un rôle prépondérant dans la réponse anti-tumorale?

Le nombre maximum d'animaux sera de 20 animaux.

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

- Remplacer : A ce jour, aucune expérience *in vitro* ou modélisation informatique ne permet de rendre compte des modèles tumoraux.

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats 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 d'animaux nécessaire aux deux objectifs sera de 20. L'injection de ces cellules en sous cutanée est maîtrisée au laboratoire.

-Raffiner : Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement la tumeur qui représente un point limite majeur, la charge tumorale ne devant pas dépasser 10% du poids de l'animal. Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant une charge tumorale excédant 10% de leur poids. Par ailleurs, l'état général de l'animaux sera aussi suivi quotidiennement.

Tous les animaux seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans la moelle épinière, et par immuno-histologie pour étudier l'infiltration de cellules dans les tissus inflammés.

16316 Le projet de recherche a pour objectif de comprendre les mécanismes de formation du cœur, et la mise en place de l'architecture de la pompe cardiaque. Le muscle cardiaque, ou myocarde, est le tissu principal du cœur. Sa taille et son architecture orientée déterminent la contraction efficace du cœur. La disposition relative des chambres cardiaques est essentielle à la mise en place de la double circulation sanguine. Par l'étude de modèles rongeurs déficients pour des voies de signalisation, nous voulons mettre en évidence les mécanismes de croissance du myocarde et de positionnement des chambres cardiaques.

Nous utilisons différentes approches pour aborder ces questions, incluant la modélisation informatique (*in silico*) et les cultures cellulaires (*in vitro*), selon le principe de Remplacement. Cependant, les lignées cellulaires congelées ont dérivé de leur état initial et nous leur préférons des cultures primaires, correspondant à des cellules fraîchement dissociées d'un tissu. Ces cellules sont plus facilement obtenues à partir de rats. En général, les expériences de remplacement ne peuvent pas reproduire la complexité des mécanismes mis en jeu au cours du développement embryonnaire, comme la forme tridimensionnelle du cœur, l'intégration d'une multitude de signaux et d'interactions cellulaires. C'est pourquoi nous aurons aussi recours à l'étude d'embryons de souris porteurs de mutations dans différents gènes dont la fonction est importante au cours du développement. Nous produirons des souris génétiquement modifiées, à l'état hétérozygote, ne présentant pas d'anomalie clinique. A partir de ces animaux, nous produirons des foetus ou nouveau-nés à l'état homozygote, afin d'étudier l'effet de la mutation sur le cœur, dans des analyses post-mortem. Nous aurons recours à des injections de substance ou de virus, afin de contrôler le moment où la mutation survient, de mesurer l'effet sur la multiplication des cellules ou de compenser l'effet de la mutation. La fonction cardiaque, sera mesurée par échocardiographie sur des animaux sous anesthésie générale. Au cours de ces procédures, les animaux seront surveillés pour repérer l'éventuelle apparition de signes cliniques pouvant indiquer une souffrance ou un mal-être. Selon le principe de Réduction, le nombre d'animaux est calculé sur la base d'un plan expérimental stéréotypé permettant d'obtenir la puissance statistique nécessaire à l'obtention de conclusions biologiquement pertinentes. Le projet, prévu sur une durée de 5 ans, aura recours à 1474 animaux: 450 foetus de souris, 580 souris nouveau-nés, 225 souriceaux et 186 souris adultes, ainsi que 3 rats adultes et 30 rats nouveau-nés.

Ce projet de recherche fondamentale sur la formation du cœur a des retombées pour la compréhension des malformations cardiaques, qui affectent près de 1% des naissances, ainsi qu'en médecine régénérative, pour trouver des stratégies de réparation du cœur.

16317 Le glioblastome multiforme est la tumeur primitive du système nerveux central la plus fréquente chez l'adulte, associé à une morbidité et une mortalité très élevées, notamment en raison de son caractère très invasif.

Dans de nombreux cas, les cellules tumorales infiltrant le tissu cérébral et migrent à distance de la masse tumorale principale, source d'échappement aux thérapies locales et voie éventuelle de développement de nouveaux foyers cancéreux. L'étude sur tissus provenant de patients et de modèles précliniques démontre que les cellules de glioblastome infiltrant le tissu cérébral en empruntant des structures préexistantes, telles que les fibres nerveuses et les vaisseaux sanguins.

L'objectif de ce projet est de comprendre comment les cellules tumorales migrent au sein du cerveau et en particulier le long des fibres nerveuses. Nous travaillerons dans un modèle murin de glioblastome multiforme (souris immunocompétentes C57BL6 et immunodéprimées Nude), qui consiste en une greffe corticale de lignées de cellules tumorales murines ou humaines. L'utilisation de ce modèle animal nous permettra de mieux comprendre le rôle du microenvironnement cérébral sur la progression du glioblastome. Ce modèle animal n'est donc pas remplaçable par des méthodes alternatives n'utilisant pas l'animal. Ce projet comprend de l'histopathologie et des enregistrements de l'activité électrique cérébrale combinant de l'électrophysiologie et de l'optogénétique.

Dans ce projet nous caractériserons tout d'abord les interactions entre cellules tumorales et cellules nerveuses au sein du tissu, par une approche d'histopathologie et de reconstitution par imagerie 2D et 3D, sur coupes de tissus fixés et sur cerveaux entiers fixés et transparisés. Cette approche sera ensuite complétée par une étude fonctionnelle électrophysiologique *ex vivo* et *in vivo*, sur tranches de cerveau et sur animal vigile. Puis, nous évaluerons l'impact de l'activité cérébrale sur la migration tumorale par des approches d'optogénétique et d'électrophysiologie *ex vivo* sur tranches de cerveau et *in vivo* sur animal vigile et anesthésié. Quatre lignées de cellules tumorales seront utilisées. Des groupes CONTROLE (Souris Naïves) et SHAM (Souris sans tumeur) sont nécessaires, autant dans les expériences utilisant des souris immunocompétentes que de souris immunodéprimées Nude) pour éviter des biais d'interprétation. Détaillé sur 5 ans, il comprendra un maximum de 1590 souris, avec un maximum de 10 animaux par groupe pour les expériences *in vivo* et un maximum de 5 animaux par groupe pour les expériences *ex vivo*. Ce projet inclut une partie d'expériences pilotes qui permettront

de réduire le nombre effectif d'animaux par expérience. Ainsi, le nombre minimum d'animaux sera utilisé. De plus, les animaux seront hébergés en groupe dans des conditions réglementaires. Les souris seront nourries et abreuvées ad libitum selon un rythme nyctéméral de 12h/12h, à 22°C. Il y a dans chaque cage un enrichissement. Le bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement afin de détecter des signes précoces de stress ou de douleur. Après la greffe, les animaux seront en plus pesés pour détecter des pertes de poids anormales (révélateurs de douleur et/ou stress éventuels). Les expériences et le suivi des animaux sera réalisé par du personnel expérimenté. Ce nouveau projet de recherche est en accord avec la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner), et s'intègre dans meilleure compréhension de l'influence du microenvironnement cérébral sur la progression de cancers cérébraux.

16318 L'apprentissage par problèmes et par projet (APP) est une formule pédagogique qui mise sur la participation active de l'étudiant dans le processus d'apprentissage. Dans cette formule les étudiants de 1^{ère} année de maîtrise (M1), regroupés par 4 ou 5, travaillent ensemble à résoudre un problème ou une question scientifique en réalisant des expériences dans plusieurs laboratoires. Ce projet est un des maillons d'une APP qui propose aux étudiants de découvrir les différents niveaux d'intégration de l'information sensorielle tactile depuis la périphérie jusqu'aux centres supérieurs, chez l'homme et dans des modèles murins.

L'information tactile prend naissance à la périphérie par la stimulation des terminaisons nerveuses de neurones sensoriels des ganglions dorsaux rachidiens et des trijumeaux. Le but de ce projet est de faire découvrir aux étudiants de M1, les techniques comportementales d'évaluation de la sensibilité tactile chez la souris. Pour réaliser ce projet, 25 souris seront utilisées afin d'observer et de comparer la sensibilité d'animaux en condition physiologique et inflammatoire. La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée ; mais la sensibilité / douleur mécanique ne peut s'évaluer in fine que sur des animaux vivants. Réduction du nombre d'animaux puisque les étudiants bénéficieront des données brutes du laboratoire pour augmenter le nombre d'animaux et faire des tests statistiques. Le nombre de souris par cage respectera les directives européennes du 1^{er} février 2013, sachant que le projet utilise de jeunes adultes entre 20 et 25g, nécessitant 70 cm² par individus dans les cages, soit 5 animaux par cage de 374 cm². Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux. 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.

16319 La participation du microbiote de l'intestin à l'axe de communication intestin-cerveau est dorénavant reconnue. Ces dernières années, plusieurs études chez le rongeur ont montré que l'administration de probiotiques (micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels) avait un effet positif sur la réponse au stress et sur les comportements de type anxieux et dépressif. Dans ce projet nous rechercherons si l'administration orale d'un mélange de deux probiotiques chez la souris peut atténuer ou supprimer un comportement de type anxieux. Nous comparerons nos résultats avec ceux obtenus avec une molécule anxiolytique de référence. Cette étude se fait sur des souris BALB/c rendues anxieuses par une procédure de stress chronique de contention ; le niveau d'anxiété est évalué à l'aide d'un test de labyrinthe en croix surélevé et un open-field.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'étudier ce type d'interactions complexes entre un microbiote intestinal particulier, le fonctionnement du cerveau et la survenue de troubles comportementaux. Le nombre minimum de souris (96, c'est à dire 6 groupes expérimentaux de 16 souris) se justifie par les analyses comportementales qui nécessitent un minimum d'animaux pour être statistiquement exploitables. Les souris proviennent d'élevages reconnus et sont nées en captivité. Hormis le stress chronique induit, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude, du fait du caractère peu invasif des protocoles. Les interventions sur les souris seront faites par des personnels expérimentés. Un suivi quotidien permettra de réagir de façon adéquate en cas de besoin. Les points limites observés seront l'attitude des animaux, l'état de leur pelage et l'évolution de leur poids. Les souris seront 5 par cage et un enrichissement de milieu sous forme de sopalin à déchiqueter et de

bâtons de bois à ronger est prévu. . L'ensemble des soins donnés aux souris visera à satisfaire le mieux possible leurs besoins physiologiques et comportementaux, conformément à la législation. L'état de santé et de bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement.

16320 Les perturbations métaboliques liées à une alimentation riche en graisse tel que l'obésité ou le diabète de type 2 participent en grande partie à l'apparition de pathologies hépatiques tel que la NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease). La NAFLD se manifeste initialement par une stéatose isolée (l'accumulation de gras dans le foie). Dans 30% des cas, cette NAFLD évolue vers le stade de NASH (Non Alcoholic Steato-Hepatitis), et est caractérisée par la présence de stéatose avec des lésions inflammatoires hépatiques, un dépôt de fibrose, associé également à une augmentation de la perméabilité intestinale. Dans 3% des cas, la NASH va évoluer en cirrhose et ses complications (insuffisance hépatocellulaire, varices oesophagiennes, carcinome hépatocellulaire). Avec l'augmentation de la prévalence de l'obésité, la NAFLD est devenue la cause la plus fréquente d'hépatopathie chronique dans les pays occidentaux. Bien que la présence d'une stéatose isolée ne modifie pas le pronostic vital des patients, la présence d'une NASH est associée au développement de complications cardiovasculaires et à une diminution significative de l'espérance de vie. Il n'existe actuellement pas de traitement pharmacologique validé dans la NASH. Comprendre les mécanismes qui conduisent au développement de la NASH est une question de plus en plus importante. L'augmentation de la perméabilité intestinale observée lors de la NASH favorise le développement des maladies hépatiques en permettant la translocation bactérienne (passage de bactéries ou du constituant bactérien dans la circulation sanguine). Les vésicules extracellulaires (VE), des microstructures provenant de différents compartiments subcellulaires, participent à la communication intercellulaire et modulent de nombreux processus physio-pathologiques.

Nos résultats *in vitro*, montrent que les VE issues des patients atteints de NASH ou de NAFLD sont capables de modifier le métabolisme des différents types cellulaires impliqués dans la physiopathologie hépatique (hépatocyte, cellule stellaire, endothéliales), mais également favoriserait la perméabilité intestinale. Ces résultats montrent que les VEs pourraient intervenir dans la pathogénèse et la progression des maladies hépatiques.

Le but de cette étude est donc d'évaluer les effets des VEs sur la perméabilité intestinale et de valider leur rôle dans la progression des maladies hépatiques et dans les conséquences cardiovasculaires.

Pour cela, nous utiliserons des souris déficientes pour la protéine kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK $-/-$; KO) et des souris de phénotype sauvage (WT). La délétion de cette protéine protège les souris de l'inflammation (par exemple, en bloquant la translocation bactérienne), car la perméabilité de leurs barrières (intestinale et vasculaire) reste inaltérée. Les souris seront soumises à un régime alimentaire riche en graisse (hypercholestérolémique) permettant le développement de la NAFLD et à long terme d'une NASH. Les effets des VE administrées par gavage seront déterminés par la comparaison des mesures de différents paramètres avec des souris contrôles non obèses.

Les paramètres métaboliques tels que le poids, la tolérance au glucose à l'insuline, la glycémie, cholestérolémie, triglycéridémie, insulinémie seront évalués sur le plasma des animaux. Les modifications cardiovasculaires seront évaluées par échographie et celle de la pression artérielle par la technique du manchon caudal. La perméabilité intestinale de ces souris sera évaluée à partir de test de FITC. Enfin l'analyse de coupes histologiques (morphométrique et immunologique) de différents tissus et organes (tissus adipeux, foie, muscle, cœur, aorte, intestins) prélevés sur animaux sacrifiés complètera cette analyse. Cette étude a un caractère de stricte nécessité et ne peut 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.

Tout au long de l'étude, nous veillerons à respecter la règle des 3R. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour 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 sera évaluée par la réalisation d'un score clinique. Une grille présentant les points limites (Annexe) sera utilisée pour déterminer la conduite à tenir. L'apparition de douleur ou d'atteinte de

l'intégrité physique de l'animal engendrera une prise en charge de la douleur (anesthésiants, analgésique), des soins ou une sortie de l'animal de l'expérimentation.

Afin de répondre à l'utilisation d'une analyse multi variée des paramètres observés, nous avons établis à un nombre de 400 souris maximum nécessaires à cette étude. Soit Deux cent quarante (240) souris obèses (dont 120WT et 120 KO) et 160 souris non obèses (dont 80WT et 80KO).

Cette étude nous permettra d'augmenter les connaissances mécanistiques et le rôle de VEs en vue d'améliorer la performance thérapeutique des maladies hépatiques, chez l'homme.

16321 Le sepsis est un syndrome regroupant des éléments cliniques et biologiques, il est caractérisé par une réaction inflammatoire systémique de l'hôte en réponse à une infection. Selon la sévérité clinique, il existe un continuum entre sepsis, sepsis sévère et choc septique.

Le choc septique est une insuffisance cardiocirculatoire aiguë associée à des troubles inflammatoires et métaboliques survenant au cours d'une infection grave (en générale d'origine bactérienne : septicémie, péritonite...). Ces troubles hémodynamiques sévères peuvent aboutir à une défaillance multi-viscérale et au décès du patient en l'absence de prise en charge. Il s'agit d'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 50%. Actuellement, les options de traitement restent limitées à un traitement antibiotique précoce, à la réanimation et à essayer de maintenir un bon fonctionnement des différents organes défaillants conduisant à la mort de plus de 45 000 personnes par an en France. Il devient donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le modèle par ligature et perforation caecale (CLP) est développé depuis une quarantaine d'années, principalement chez le rongeur. La contamination bactérienne stercorale provoquée par la perforation entraîne une péritonite et un choc septique dont la physiopathologie est proche d'un choc septique par rupture d'organe creux chez l'humain (péritonite par perforation). La standardisation de la procédure, et notamment du nombre et de la taille des perforations caecales permet l'obtention d'une mortalité prédictible et proche de la pathologie humaine. La bonne adéquation du modèle à la pathologie humaine et sa simplicité de mise en œuvre sont les atouts majeurs de la CLP qui est reconnue comme modèle de référence.

L'objectif de notre projet consiste à étudier les rôles de molécules modulant l'activité de récepteurs nucléaires impliqués dans les mécanismes de l'inflammation, du métabolisme et ayant des propriétés protectrices de la fonction cardiovasculaire.

Pour cela, nous prévoyons dans cette étude une première phase de mise au point qui permettra de déterminer les conditions optimales pour induire un choc septique sévère.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, la procédure expérimentale de cette première étape sera réalisée sur des effectifs réduits afin de tester les différentes conditions pour induire un choc septique sévère. Dans un second temps, lorsque les conditions d'utilisation optimales auront été déterminées, les procédures seront réalisées en utilisant un antibiotique afin d'obtenir un modèle se rapprochant de la pathologie humaine.

Pour finir, l'effet des composés sera réalisé sur un plus grand nombre d'animaux avec seulement les conditions sélectionnées dans les deux premières étapes.

Dans ce projet et afin de répondre à la règle des 3 R, nous avons calculé le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure pour avoir une réponse statistiquement analysable afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires dans les expériences. Les procédures utilisées se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé avec des personnes habilitées, 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 afin de raffiner au maximum les procédures. Afin de prévenir des souffrances non nécessaires et de ne pas altérer les résultats de l'étude, des points limites seront définis, au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude et mis à mort de façon éthique. Compte tenu que le choc septique implique un dysfonctionnement de plusieurs organes, il nous est impossible de remplacer cette expérimentation par des expériences *in vitro*. Cependant, une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant

ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux. Ainsi le nombre total de souris prévu est de 1730 pour une durée de 5 ans.

16322 *Staphylococcus aureus* est l'une des principales causes d'infections bactériennes chez l'être humain dans le monde. En effet, ce pathogène est responsable à lui seul d'un tiers des infections cutanées et ostéo-articulaires, et d'un quart des infections broncho-pulmonaires et septicémies (présence de bactéries dans le sang). La mortalité attribuée à *S. aureus* est également élevée. Aux Etats-Unis par exemple, on estime à 20 000 par an le nombre de décès dus à *S. aureus*.

Du fait de leur fréquence et de leur gravité potentielle, les infections à *S. aureus* constituent un problème majeur de santé publique, et il existe une attente très forte concernant le développement d'approches vaccinales efficaces. Différentes formulations vaccinales visant à prévenir les infections humaines à *S. aureus* ont été développées au cours de ces dernières années. Or, les essais cliniques réalisés à ce jour ont été décevants pour l'ensemble de ces vaccins, du fait principalement de taux d'anticorps protecteurs insuffisants.

C'est sur ce constat que nous avons récemment mis au point une stratégie de sélection d'antigènes vaccinaux de *S. aureus* en deux temps :

1. Analyse de la réponse immunitaire en situation clinique réelle : sélection d'antigènes de surface qui génèrent naturellement la production de taux élevés d'anticorps au cours des infections à *S. aureus* chez l'humain ;
2. Test de criblage *in vitro* : sélection d'antigènes associés à la production d'anticorps permettant la destruction de *S. aureus* par les globules blancs.

Cette stratégie nous a permis d'identifier trois antigènes qui se sont révélés supérieurs aux autres antigènes vaccinaux par leur capacité, dans notre test *in vitro*, à induire des anticorps favorisant la destruction de *S. aureus* par les globules blancs (brevet européen déposé en décembre 2019).

L'objectif du présent projet est de déterminer si ces antigènes sont capables de générer une réponse anticorps protectrice vis-à-vis de *S. aureus in vivo* chez la souris. Plus spécifiquement, l'effet protecteur des différents antigènes vaccinaux sera jugé sur la capacité à contrôler de faibles charges bactériennes dans le sang (une des voies majeures de contamination du matériel étranger, tel que des prothèses ostéo-articulaires, par *S. aureus*).

Dans un premier temps, nous réaliserons une étude pilote afin de mettre au point les conditions permettant d'obtenir une bactériémie faible chez les animaux. Les souris seront infectées sous anesthésie par des doses croissantes de *S. aureus* et euthanasiées à H3 et H24 pour dénombrement de *S. aureus* dans la rate, le foie, les poumons, les reins.

Cette étude pilote nécessitera un nombre total maximum de 48 animaux.

Dans un second temps, nous réaliserons l'essai de protection vaccinale proprement dit : les animaux recevront trois doses d'antigène (ou de contrôle), et seront infectés deux semaines plus tard par *S. aureus* pour déterminer le degré de protection obtenu (réduction de la charge bactérienne dans les organes précités à H3 et H24 post-inoculation).

Cet essai de protection portera sur nos trois antigènes d'intérêt comparativement à trois contrôles négatifs et trois contrôles positifs (antigènes vaccinaux connus), et nécessitera un nombre total de 216 animaux (9 sous-groupes de 24 animaux).

Au total, le projet dans son ensemble nécessitera donc un nombre maximum de 264 animaux.

Concernant la règle des « 3R » :

- Le recours à des animaux est indispensable à ce stade du processus d'évaluation préclinique dans une perspective de développement réglementaire du vaccin envisagé ; nous utiliserons des souris BALB/c, qui sont particulièrement sensibles à l'infection par *S. aureus*.
- Les expériences ont été organisées de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux : i) étude préalable de « calibration » du modèle ; ii) essai vaccinal comportant un nombre limité de contrôles négatifs (n=3) et, surtout, de contrôles positifs (n=3) ; iii) nombre minimal d'animaux par sous-groupe (étude pilote, n=4 ; essai vaccinal, n=6).

•Enfin, le bien-être des animaux a été une préoccupation constante à tous les stades des expériences, qu'il s'agisse de l'hébergement, des soins ou des différents modes opératoires. C'est d'ailleurs une des raisons pour laquelle nous avons choisi de ne pas réaliser notre étude de protection vaccinale par cinétique de survie après challenge léthal, un mode opératoire qui génère des effets délétères chez les animaux. Concernant l'ensemble des expériences, il faut d'ailleurs souligner qu'il n'est attendu aucun effet secondaire chez les animaux jusqu'à leur euthanasie (protocole d'immunisation simple et challenges infectieux systémiques à doses faibles).

Les soins et les gestes opératoires seront effectués par du personnel expérimenté et qualifié.

La surveillance des animaux reposera sur la prise de poids et de température (quotidienne lors du challenge infectieux, hebdomadaire lors de la période d'immunisation), ainsi que sur un suivi quotidien de l'état général de l'animal.

Les animaux bénéficieront d'un enrichissement du milieu.

16323 La sclérose latérale amyotrophique (SLA), aussi connue sous le nom de maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative grave qui se traduit par une paralysie progressive des muscles impliqués dans la motricité volontaire. Elle affecte également la phonation et la déglutition.

Il s'agit d'une maladie au pronostic sombre, dont l'issue est fatale après 3 à 5 ans d'évolution en moyenne. Le plus souvent, c'est l'atteinte des muscles respiratoires qui cause le décès des patients.

Cette maladie résulte d'une dysfonction et d'une perte des motoneurones. Cette approche sera utilisée aussi pour une autre maladie neurologique avec des mécanismes similaires de physiopathologie, l'épilepsie. Nous développerons des lignées de poissons zèbres n'exprimant pas ces gènes ou dont certains gènes d'intérêts seront marqués grâce à une protéine fluorescente pour étudier les mécanismes moléculaires et pathologiques de la SLA causant la dégénération des motoneurones et les faiblesses musculaires. Le génotype de ces poissons sera déterminé suite à une biopsie de la nageoire caudale.

Les modèles de poisson zèbre de la SLA ont été utilisés avec succès pour étudier les interactions génétiques et pour rechercher des composés thérapeutiques dans cette maladie. Le poisson zèbre est un organisme vertébré simple qui présente une réponse motrice stéréotypée à 48 heures de la vie et qui présente l'avantage d'être transparent à ce stade, ce qui permet une imagerie en direct des processus cellulaires. En raison de sa petite taille, le poisson zèbre peut également être utilisé pour le criblage de médicaments précliniques à haut débit.

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 9250 poissons zèbre est estimé pour une durée de 5ans. Il s'agit du nombre d'animaux jugé nécessaire pour maintenir les lignées nécessaires à ce projet. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Une surveillance quotidienne sera également mise en place. De plus, un enrichissement du milieu sera effectué par la constitution de groupes sociaux, la mise en reproduction régulière et l'ajout de nourriture vivante. Des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si besoin. Autant que possible, l'utilisation du modèle animal sera remplacée par des études *in vitro* et l'utilisation de larves de moins de 5 jours sera favorisé.

Ce projet a pour but principal de faire le lien entre la recherche fondamentale et la recherche clinique. Il vise à comprendre les interactions entre les principaux gènes impliqués dans la SLA pour développer dans un futur proche de nouvelles cibles thérapeutiques.

16324 En 2013, deux rapports internationaux alertent sur la problématique de la résistance aux antibiotiques:

- La déclaration commune des académies du G-Science titre : « La résistance d'agents infectieux aux médicaments antimicrobiens, une menace globale pour l'humanité ».
- La 8e édition du « Global Risks report » a évalué les surcoûts pour les organismes de santé publique engendrés par la résistance aux antibiotiques.

99 000 décès par an aux États-Unis et un surcoût pour les organismes de santé estimé entre 21 et 34 milliards de dollars ; 25 000 décès en Europe et un coût de 1,5 milliards d'euros.

En juin 2013, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament rapporte que le nombre de substances actives a diminué de 29 et que seulement 11 nouveaux antibiotiques ont été mis sur le marché durant la période 2000-2012 (*Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012*).

Dans l'approche des traitements des maladies infectieuses, le développement de modèles de pharmacologie *in vivo* demeure indispensable. Les tests *in vitro* à dispositions, effectués préalablement pour valider l'intérêt de la cible, ne permettent pas d'appréhender les mécanismes d'action de l'infection et les interactions hôtes/pathogènes.

Le nombre croissant d'antibiorésistances et d'infections nosocomiales sont clairement identifiés comme un besoin de santé public majeur. L'OMS et l'ONU accorde une grande priorité à la lutte contre la résistance aux antibiotiques. Les dirigeants du monde se sont réunis lors de l'Assemblée générale des Nations Unies à New York le 21 septembre 2016, pour s'engager à combattre ensemble la résistance aux antimicrobiens et à préserver la capacité de prévenir et traiter les maladies infectieuses à l'aide de nouveaux médicaments sûrs et efficaces car aujourd'hui trop peu de nouveaux antimicrobiens sont mis au point pour remplacer ceux plus anciens, de plus en plus inefficaces.

Dans l'approche des traitements des maladies infectieuses, le développement de modèles de pharmacologie *in vivo* demeure indispensable. Les tests *in vitro* à dispositions, effectués préalablement pour valider l'intérêt de la cible, ne permettent pas d'appréhender les mécanismes d'action de l'infection et les interactions hôtes/pathogènes.

L'ambition du projet est de proposer une approche innovante de stimulation des défenses immunitaires de l'organisme lors des infections bactériennes (Proof Of Concept).

Ce traitement pourra être administré seul ou en association avec une antibiothérapie plus ciblée. L'objectif scientifique et économique à terme est de diminuer l'antibiorésistance chez l'homme, par une maîtrise des doses et des temps de traitement aux antibiotiques.

Pour la réalisation des expériences, nous proposons un ensemble de modèles de pharmacologie *in vivo* : maladies infectieuses, inflammation et animaux transgéniques.

Les modèles utilisés et développés pour le projet sont des modèles souris.

Une attention toute particulière est portée sur le nombre d'animaux utilisés dans le projet. Nous travaillons avec une compagnie spécialisée dans les biostatistiques. Cette collaboration nous permet d'utiliser le nombre strictement nécessaire pour chaque expérience et de l'optimiser durant toute la durée du projet.

Le nombre calculé de souris nécessaire sera au maximum 4000.

Une veille scientifique est mise en œuvre pour étudier toute méthode scientifique alternative à l'expérimentation animale dans le domaine. Pour les protocoles où la douleur ne peut pas être prise en charge par des analgésiques, une observation accrue et des critères d'arrêt plus stricts seront mis en place.

Les points limites utilisés sont:

- Le suivi du poids (le critère d'arrêt est une perte de plus de 20%)
- L'accumulation de signes cliniques : posture courbée, pelage en piloérection, respiration laborieuse, prostration ou perte d'activité, perte de réponse à un stimulus.

Pour le confort de l'animal la prévention du stress est intégrée au protocole expérimental par l'utilisation d'une anesthésie gazeuse (isoflurane) au préalable des gestes douloureux (injection intraveineuse, injection intra-urétrale, injection intra-musculaire...).

16325 L'information génétique transmise par les gamètes est compactée en fibre de chromatine dont l'unité de base se compose de protéines appelées histones. Les cellules reproductrices présentent la particularité d'utiliser des variants d'histones qui ne sont pas trouvés dans les tissus somatiques et sont uniques à chaque espèce. Ces variants sont parfois induits de manière ectopique dans certains cancers. Que ce soit au cours de la reproduction ou dans un contexte pathologique, les fonctions spécifiques de nombreux de ces variants d'histones restent, à ce jour, inconnues.

Ce protocole vise à identifier les fonctions de ces variants, appelé H2A.B et H2A.P. Ces variants se trouvant exclusivement chez les mammifères placentaires, l'étude de leurs fonctions *in vivo* nécessite une approche en modèle murins. Nous avons déjà mis en place des souris mutantes pour ces histones (H2A.B KO et H2A.P KO, ou H2A.B/P DKO, manuscrit en préparation). En développant ce protocole, mon équipe étudiera les conséquences de la perte de H2A.B, de H2A.P ou des deux, sur la structure de la chromatine des cellules reproductrices mâles. Nous explorerons ensuite comment ces histones influencent le développement embryonnaire précoce. Nous avons aussi développé un modèle d'induction ectopique de H2A.B (H2A.B_{cre}). Notre équipe analysera les effets de l'expression ectopique de ces variants. Dans son ensemble, ce projet permettra de comprendre de nouveaux mécanismes mis en jeu lors de la reproduction et de la carcinogénèse. L'identification des fonctions de ces variants d'histones ouvrira de nouvelles pistes thérapeutiques aussi bien ciblant certains cancers que combattant des infertilités.

Les modèles murins présents dans ce protocole restent à ce jour unique à notre équipe et le projet a pour but de les phénotyper. Ils sont donc d'une importance capitale pour la compréhension des processus biologiques mis en jeu. Ces processus ne sont pas reproductible en dehors de l'animal et notre choix d'utiliser la souris répond aux critères de fertilité et de temps de générations requis pour une étude expérimentale en laboratoire. L'utilisation de modèle murins est avantageuse compte tenu du large corps de connaissances existant ainsi que pour ces similarités avec l'homme. Cette demande minimise le nombre d'animaux sur la durée totale du projet (3ans) à une colonie de maintenance, produisant moins de 1000 animaux, et une colonie expérimentale de moins 200 animaux. En incluant les génotypes non-désirés le nombre total d'animaux est de 1084. Ce nombre sera réduit chaque fois que possible y compris en fonction de résultats préliminaires ou publication. Le niveau d'anxiété et de douleurs invoqué lors de l'expérimentation est aussi minimisé et ne dépasse pas celui associé à des injections intrapéritonéales pour un groupe réduit d'animaux (10). La majorité de l'expérimentation s'effectue post-mortem (collecte de tissu expérimentaux).

Aucun stress ni douleur ne sont attendus 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 et copeaux permettant de nicher).

16326 Ce projet encadre l'utilisation d'animaux pour la formation continue du personnel effectuée en interne. Cette formation est obligatoire et est complémentaire à la formation spécialisée en expérimentation animale qui est un prérequis. La formation interne permet d'acquérir les compétences nécessaires pour effectuer des gestes techniques auprès de personnes déjà formées (formation par des pairs). L'entraînement permet de s'assurer que le geste est toujours acquis. Le personnel est régulièrement évalué pour s'assurer qu'il maîtrise le geste technique. La fréquence des évaluations dépendra de la complexité du geste.

Seules des personnes formées et compétentes peuvent participer aux expériences, entretenir les animaux ainsi qu'être responsables de la mise à mort. La compétence du personnel est nécessaire pour assurer la bonne réalisation de l'étude et permettre ainsi d'obtenir des résultats fiables, tout en utilisant le moins d'animaux possible. La formation et les évaluations sont tracées dans le livret de compétence de la personne formée.

Ce projet s'applique à toute utilisation de souris et de rats permettant d'assurer la formation continue du personnel pour des gestes tels que la contention des animaux, les techniques d'administrations et de prélèvements, l'anesthésie et la mise à mort. Afin de limiter le nombre et la fréquence des gestes effectués sur le même animal, nous avons mis au point un système de score. Ce score traduit les contraintes associées à chaque geste et par accumulation (et un score maximal), il permet de s'assurer du suivi et du bien-être de l'animal.

L'utilisation d'animaux est réalisée lorsque la formation par des méthodes alternatives est impossible. Lorsque le geste technique est susceptible d'engendrer une douleur ou souffrance des anesthésiques et/ou des analgésiques sont administrés. La formation est encadrée par une personne compétente au

geste enseigné et/ou par un vétérinaire. La bonne acquisition du geste est ensuite évaluée par un pair compétent.

Les animaux utilisés pourront être des animaux provenant d'un autre projet, en accord avec la réglementation à ce sujet. Le nombre total d'animaux utilisés pour les 5 ans du projet est de 3000 animaux (soit, par an, 400 souris et 200 rats). Le nombre d'animaux ainsi prévu permet de former et de maintenir le niveau de compétence de l'ensemble du personnel utilisateurs d'animaux.

16327 Le syndrome de la défaillance multiviscérale (SDMV), fréquemment rencontré en réanimation, est caractérisé par la décompensation simultanée ou consécutive d'au moins deux organes. C'est la conséquence ultime d'un grand nombre d'affections médicales ou chirurgicales entraînant des lésions tissulaires, comme le choc septique, l'arrêt cardiaque, ou les suites d'interventions chirurgicales cardiovasculaires ou digestives majeures. Plus de la moitié des patients atteints de ce syndrome décèdent à l'heure actuelle. Toutefois, sa prise en charge est actuellement limitée au soutien pharmacologique ou mécanique des organes sans traitement de la cause sous-jacente. Dans un projet antérieur, le laboratoire a montré que l'utilisation d'un gaz noble, l'Argon, pouvait induire des effets néphro- et hépato-protecteurs dans un modèle de SDMV.

Notre hypothèse est que l'Argon exerce un effet anti-inflammatoire en limitant le relargage systémique des « Damage Associated Molecular Patterns » (DAMPs) au cours du SDMV induit par clampage aortique supra-cœliaque chez le lapin. Cet effet sera évalué en association, ou en comparaison, à celui d'une inhalation de monoxyde d'azote, en tant qu'anti-ischémique de référence.

Dans ce projet, nous utiliserons 6 porcs et 50 lapins sur une période de 3 ans. Le SDMV ne peut pas être étudié *in vitro* (absence de Remplacement possible). Les agressions ischémiques systémiques sont en effet des situations complexes impliquant de nombreuses interactions multiviscérales. Nous avons calculé statistiquement le nombre d'animaux nécessaire pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux (Réduction). Les animaux seront sous anesthésie générale pendant toute la procédure (Raffinement).

16328 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie congénitale liée au chromosome X qui provoque une faiblesse musculaire progressive chez les jeunes garçons en raison d'une mutation génétique dans le gène *dmd* de la dystrophine, protéine qui permet le maintien de l'intégrité des membranes des cellules musculaires lisses, striées squelettiques et cardiaques. Les garçons touchés par la DMD ne vivent en moyenne que 19 ans, et décèdent généralement suite à une insuffisance cardio-respiratoire. Il n'existe actuellement aucun remède, mais de nouveaux traitements sont en cours d'élaboration. Toutefois, les nouvelles approches développées dans les modèles actuellement disponibles, ne parviennent souvent pas à démontrer la même efficacité chez les patients, ceci sans doute parce qu'ils sont élaborés chez la souris, modèle dont la gravité des symptômes n'atteint pas celle des patients. En outre, la plupart des modèles en cours d'utilisation n'ont pas les mêmes mutations que celles présentes dans la population de patients.

L'objectif de ce projet est d'accoître le nombre d'individus de deux nouveaux modèles de la DMD développés chez le rat afin d'en caractériser le phénotype en espérant qu'il mime parfaitement la pathologie humaine et ceci pour les utiliser par la suite pour le développement d'un traitement efficace de la DMD. Les animaux ont été générés par manipulation génétique en utilisant des mutations du gène *dmd* identifiées chez les patients.

A ce jour, même si les techniques utilisées permettent un travail en amont de mise au point *in vitro* des thérapies visant la myopathie de Duchenne, les modèles de culture cellulaire sont limités lorsqu'il s'agit d'évaluer un bénéfice thérapeutique à l'échelle de l'organisme et les différentes fonctions touchées, sur le long terme. C'est pourquoi les tests précliniques de thérapie de la DMD nécessitent une validation *in vivo* et donc le recours aux modèles animaux. Cependant afin réduire le nombre d'individus utilisés, les rats seront soumis lorsque cela sera possible à une combinaison de différents types de tests fonctionnels (test d'agrippement, tapis roulant et mesure de la fonction cardio-respiratoire) puis d'analyses histologiques et de biologie moléculaire et cellulaire. Les animaux malades seront comparés à des animaux sains de même âge et seront mis à mort à l'âge de 3 et 6 semaines, 3, 6, 8, 10 et 12 mois pour étudier le décours naturel de la maladie et en apprécier les similitudes avec la pathologie

humaine. Par ailleurs, nos analyses sur les premiers mois permettront probablement de déterminer si l'une ou l'autre des lignées est fidèle à la pathologie humaine au quel cas seule la lignée la plus représentative sera conservée pour la suite du projet réduisant ainsi le nombre de rats utilisés.

Les animaux seront hébergés par 2 selon le type (ex: rats malades ensemble) pour éviter une éventuelle compétition pour l'accès à la nourriture. Ils disposeront d'un enrichissement approprié à leur espèce, de nourriture et d'eau ad libitum. Ils seront dès leur plus jeune âge habitués à la manipulation par les zootechniciens afin de faciliter les différents tests pratiqués sur animaux vigiles ainsi que les prélèvements de sang. Des friandises seront distribuées pour les stimuler et les récompenser à la réalisation des tests. Ils bénéficieront d'un suivi vétérinaire quotidien afin de prévenir au mieux les complications liées à leur maladie. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile seront définis au cours de cette caractérisation afin de pouvoir prévenir la douleur et le stress dans les futures études.

Dans ce projet, nous utiliserons un total de 456 rats dans 3 procédures: 1/ établissement et maintien des deux colonies, 2/ établissement de la courbe de survie des deux colonies pour voir si la maladie affecte la longévité des rats comme chez les patients, 3/ caractérisation de la pathologie chez les rats pour voir si elle reproduit toutes les caractéristiques observées chez les patients.

16329 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 contribue 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 regarder l'effet du KO de l'enzyme Gls2 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.

Afin d'observer notre hypothèse de l'influence de l'enzyme Gls2 sur le développement de l'athérosclérose, nous croiserons un modèle de souris GLS2 KO constitutive (<https://www.taconic.com/knockout-mouse/gls2-trapped>) de phénotype stable, avec nos souris ApoE KO, validées pour notre modèle cardiovasculaire.

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 générés 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.

16330 Les vaisseaux sanguins irriguent les tumeurs, apportent les nutriments nécessaires à leur croissance et permettent aux cellules tumorales de s'échapper pour former des métastases. De nombreuses stratégies anticancéreuses visent ces vaisseaux sanguins mais comme tout traitement utilisant une substance étrangère, elles présentent des effets secondaires. Dans la stratégie que nous avons développé avec nos partenaires nous utilisons des gouttes sensibles aux ultrasons. A l'aide d'une impulsion d'ultrasons, nous sommes en mesure de faire éclater ces gouttes sur une zone extrêmement restreinte avec pour conséquence une dégradation des membranes des cellules avoisinantes. Nous avons réalisé l'ensemble des expériences sur cellules nécessaire à la validation de la preuve de concept. Dans le présent projet, nous souhaitons transposer l'étude sur des animaux. Pour cela, nous souhaitons réaliser une cartographie par échographie haute résolution du réseau vasculaire de la tumeur avant et après explosion des gouttes par l'impulsion d'ultrasons au niveau de la tumeur. La stratégie d'explosion des gouttes a déjà été étudiée par notre groupe. L'originalité du projet consistera à suivre en direct par imagerie de haute résolution les perturbations engendrées sur la microvascularisation tumorales par la vaporisation de ces gouttes.

Les données recueillies lors de nos précédentes expériences sur la vaporisation des gouttes ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique, la « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées au mieux (groupe de 3 à 5 souris, nid, jouets, etc) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). Afin de pouvoir étudier la capacité de notre technologie à réaliser une cartographie haute résolution du réseau vasculaire de la tumeur chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro* (remplacer). Ainsi, ce projet sera composé d'une seule procédure expérimentale qui nécessitera 30 souris.

16331 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, communément appelée cellule gliale régule l'efficacité avec laquelle les neurones communiquent. Pour se faire, tout comme les neurones, les astrocytes libèrent des substances actives, appelées gliotransmetteurs, comme la D-sérine.

Dans l'hippocampe, une structure jouant un rôle clé dans la mémoire et l'apprentissage, les astrocytes, en libérant la D-sérine, contrôlent à l'échelle cellulaire la mémoire synaptique. Afin que la D-sérine soit libérée au bon endroit par les astrocytes, des données dans la littérature suggèrent l'implication de plusieurs récepteurs.

Le but de ce projet est de mieux comprendre comment la mémoire se forme en identifiant comment les différents récepteurs astrocytaires interagissent afin que la D-sérine, nécessaire pour la mémoire, soit disponible à la synapse.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 462 souris, dont deux lignées transgéniques non dommageable, de fond génétique C57BL/6J et C57BL/6N. 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 462 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 (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant,...).

16332 Les muscles sont des tissus essentiels au sein de l'organisme. Ils représentent plus de 40 % de la masse corporelle et permettent le maintien de la posture et le déplacement. La régénération tissulaire est un processus essentiel pour retrouver toutes les fonctions d'un organe suite un traumatisme. Le muscle des vertébrés adultes possède une capacité remarquable de régénération dépendant des cellules souches musculaires appelées cellules satellites. Bien que les cellules satellites possèdent un grand potentiel en médecine régénérative, les mécanismes régulant leur prolifération et leur différenciation sont encore mal caractérisés.

Les glucocorticoïdes comme la cortisone sont des anti-inflammatoires prescrits dans le cas de maladies chroniques telles que l'asthme. Cependant, des traitements prolongés avec ces composés peuvent induire une perte de la masse musculaire. Les glucocorticoïdes exercent leurs actions via leur récepteur, le récepteur des glucocorticoïdes qui va contrôler l'expression de gènes cibles. Des études *in vitro* montrent que les glucocorticoïdes promeuvent la différenciation cellulaire. Nous nous demandons ainsi quel est le rôle de ces hormones dans la différenciation des cellules satellites en muscle et de ce fait au cours de la régénération musculaire. Pour ce faire, nous réaliserons une blessure dans un muscle de souris adultes en présence ou absence de glucocorticoïdes et de leur récepteur. Une fois la lésion effectuée, nous regarderons l'évolution de la régénération du muscle au cours du temps (de 1 à 28 jours après lésion). Le fait de savoir si les glucocorticoïdes sont capables d'accélérer la régénération musculaire ouvrira ainsi de nouvelles perspectives pour le traitement de patients.

REMPACEMENT : Dans cette étude, l'utilisation de modèles animaux est nécessaire pour mimer le plus fidèlement possible la dégénération et/ou la régénération fibrillaire, et observer les effets sur l'organisme entier, notamment du fait de la présence du système immunitaire qu'il est impossible de récapituler *in vitro*. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur la souris, animal pour lequel le processus de régénération musculaire est semblable à celui de l'homme et pour lequel nous disposons de tous les outils moléculaires nécessaires pour mener à bien cette étude.

REDUCTION : De nombreuses études menées au laboratoire sur la régénération musculaire 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. La patte controlatérale sera systématiquement utilisée afin de réduire de moitié le nombre d'animaux requis. La nécessité de travailler sur la souris est également motivée par le fait que les modèles cellulaires actuellement disponibles n'expriment pas le récepteur des glucocorticoïdes.

RAFFINEMENT : Certaines expériences ayant des conséquences sur le bien-être de l'animal, les souris seront anesthésiées et traitées contre la douleur par des composés analgésiques. Elles seront placées sur un support chauffant afin d'éviter toute déperdition de chaleur causée par l'anesthésie. Les souris seront suivies dans les heures suivant leur réveil. Le risque d'infection sera pris en considération au niveau de la zone d'administration du composé induisant un dommage musculaire. Étant donné que

le projet cible les muscles squelettiques, la démarche de la souris sera examinée afin de s'assurer qu'elle ne présente pas de difficultés à se déplacer.

Ce projet nécessitera des analyses à différents niveaux. Nous étudierons l'histologie des muscles mais aussi les niveaux d'expression de gènes cibles de la cardiotoxine et des glucocorticoïdes. L'ensemble de ces études requerra ainsi 2800 animaux sur trois ans.

16333 La régénération des muscles squelettiques est un processus qui permet de réparer les dommages induits par l'exercice ou les traumatismes. Ce processus de réparation musculaire fait l'objet de nombreuses études et notamment dans le cadre de maladies pour identifier les mécanismes de communication entre les différents partenaires cellulaires.

Le muscle squelettique est un organe innervé par des nerfs permettant la contraction volontaire des fibres musculaires mais également par des nerfs du système nerveux sympathique (SNS) qui modulent des fonctions telles que le métabolisme, le transport des molécules à travers la membrane et la contractilité des fibres musculaires. Des observations récentes faites au laboratoire montrent qu'il existe une proximité entre les fibres nerveuses sympathiques, les vaisseaux sanguins et les cellules souches musculaires (mSCs) suggérant un dialogue potentiel entre ces différents types cellulaires dont l'importance n'est pas encore connue.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer et de caractériser la nature des interactions entre les mSCs, les vaisseaux et les neurones sympathiques. Nous proposons d'élucider comment le SNS peut agir sur le comportement des cellules satellites dans les conditions normales d'un muscle sain et au cours du processus de régénération musculaire.

Pour répondre à l'objectif, nous allons réaliser une dénervation du SNS chez des souris adultes par un agent chimique (6-OHDA) délivré soit de façon systémique par injection intrapéritonéale (procédure 1) soit locale par injection intramusculaire (procédure 2) et ceci afin d'étudier l'effet de la dénervation sur le comportement des différentes populations cellulaires du muscle en conditions physiologique (muscle sain) ou pathologique (muscle lésé par le chlorure de baryum). Nous validerons l'implication du SNS dans la régénération musculaire en comparant nos résultats avec les effets d'une inhibition des récepteurs bêta-adrénergiques spécifiques du SNS par une injection intramusculaire d'un agent chimique inhibiteur (Propranolol) dans notre modèle de lésion musculaire induite (procédure 3). Nos analyses (histologie, biologie moléculaire, cellulaire et biochimie) des effets sur le comportement des mSCs seront faites sur des prélèvements musculaires réalisés après le sacrifice des animaux.

Pour limiter le stress et la douleur, toutes nos expérimentations seront pratiquées sous anesthésie générale à l'isoflurane et sous analgésie. La dénervation est indolore, cependant l'induction de la lésion musculaire pouvant diminuer temporairement la mobilité des souris, l'accès à la nourriture et à l'eau sera facilitée sur les 3 premiers jours après la lésion. L'environnement sera enrichi avec des maisons en plastique et du coton pour que les animaux puissent faire des nids.

Pendant la période d'acclimatation, les animaux seront hébergés par 4 puis par 2 après le protocole de destruction du SNS et de lésion musculaire pour leur permettre un comportement social tout en limitant les éventuelles altercations et en favorisant le bon déroulement du processus de régénération. Les animaux seront suivis bi-quotidiennement afin d'évaluer leur bien-être.

Expérimentalement, il n'est pas possible de reproduire la complexité d'un environnement tissulaire complexe dans un système cellulaire *in vitro* ou par modélisation mathématique, c'est pourquoi nous utilisons des modèles animaux pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la régénération musculaire. Les 3 procédures du projet mobiliseront un total de 156 souris adultes (50% mâles et 50% femelles), avec des lots de 6 à 10 animaux selon les procédures, nombre minimal nécessaire à l'obtention de résultats significatifs compte tenu de la variabilité interindividuelle et du matériel à obtenir pour réaliser l'ensemble des analyses. Si les procédures 1 et 2 ne donnent pas de résultats satisfaisants, la procédure 3 ne sera pas réalisée ce qui réduira le nombre d'animaux.

Par ailleurs, la compréhension fine de la régulation du potentiel de régénération des cellules souches musculaires pourra apporter un ensemble de données précliniques pour de futures applications thérapeutiques qui seront aussi validées sur des modèles animaux avant le passage à l'homme.

16334 Notre équipe se consacre à l'étude d'une myopathie congénitale qui affecte des êtres humains et des chiens et que nous avons pu reproduire expérimentalement chez la souris. Il s'agit dans ces trois espèces d'une myopathie modérée qui n'affecte pas la longévité des individus mais se caractérise par une faiblesse musculaire et qui se rattache à un groupe de myopathies congénitales plus large, comprenant des myopathies sévères. Notre projet vise à mieux comprendre sur le plan fondamental les mécanismes conduisant aux défauts observés et à rechercher des pistes thérapeutiques découlant de cette compréhension, qui pourraient donner lieu à un développement préclinique pour cette myopathie et potentiellement d'autres du même groupe. Grâce aux souris mutantes que nous avons développées, nous avons pu démontrer que leur faiblesse musculaire est due à la fois à un défaut de croissance des muscles au cours de leur développement et à un défaut de production d'énergie par les muscles au cours d'un effort, tout au long de la vie.

Des études récentes ont montré le potentiel thérapeutique de deux molécules, le tamoxifène et l'élamiprétide dans des contextes de myopathies proches de celui que nous étudions. A travers deux premières procédures, nous souhaitons déterminer si ces molécules sont capables d'améliorer les performances musculaires des souris que nous étudions. Le tamoxifène est un anticancéreux utilisé à grande échelle chez la femme pour éviter les récurrences de cancer du sein. Il est très bien toléré et sera distribué dans la nourriture des animaux à faible dose. L'élamiprétide est actuellement testé avec des résultats prometteurs dans des essais cliniques chez l'être humain. Il sera administré par voie sous-cutanée, en très faible volume, 6 jours sur 7.

Les procédures envisagées consisteront en une pesée hebdomadaire pour évaluer la bonne santé des animaux, une évaluation de leur métabolisme comprenant des injections et des prélèvements en nombre limité sur une courte durée et enfin, une évaluation de leurs capacités locomotrices sur tapis de course.

A l'issue de ces procédures, chaque animal donnera lieu à des prélèvements post-mortem en très grand nombre afin de recueillir le maximum de données de chaque animal utilisé grâce à des analyses transcriptomiques (expression des gènes), histologiques, biochimiques, de microscopie électronique, de biologie moléculaire et des capacités respiratoires des cellules.

En parallèle, deux autres procédures seront menées.

Tout d'abord, un grand nombre d'analyses sera réalisé *in vitro* sur des cellules en culture, prélevées à partir de muscles de jeunes souris.

Enfin, une dernière procédure, visera à reproduire les effets de la mutation du gène d'intérêt à l'âge adulte, afin de déterminer la part du phénotype myopathique lié à la moindre efficacité énergétique dans les muscles, sans le défaut de croissance musculaire rencontré dans la mutation initiale. Ce contexte permettra également d'évaluer si, comme la mutation initiale, cette situation permet de protéger les animaux de l'obésité. Cette procédure nécessitera deux étapes de croisements puis les animaux du lot d'intérêt recevront pendant 3 jours un antibiotique dans l'eau de boisson pour induire la mutation souhaitée. La procédure comprendra alors une pesée hebdomadaire pour évaluer la bonne santé des animaux, une évaluation de leur métabolisme comprenant des injections et des prélèvements en nombre limité sur une courte durée et enfin, pour certains, une évaluation de leurs capacités locomotrices sur tapis de course et pour d'autres, une alimentation riche en graisse. Là encore, chaque animal donnera lieu à des prélèvements post-mortem en très grand nombre.

A ce stade des connaissances et des méthodes substitutives disponibles, et en complément d'analyses *in vitro* que nous réalisons en parallèle, l'utilisation de souris mutantes est seule à même de permettre de tester des pistes thérapeutiques et de décrypter les conséquences métaboliques et locomotrices de ce contexte génétique.

La nécessité de disposer de suffisamment d'animaux pour déterminer de manière fiable les capacités métaboliques et locomotrices des souris myopathes font que 705 animaux seront nécessaires pour cette étude, sur cinq ans. Une partie des animaux générés sera utilisée comme reproducteurs. Enfin, chaque animal donnera lieu à un très grand nombre d'analyses post-mortem.

Nous apportons un soin extrême dans notre animalerie aux conditions de vie de nos souris, avec beaucoup de matériel d'enrichissement, une densité d'animaux adaptée à leur âge et un confort optimisé pendant la maternité. Par ailleurs, les animaux qui pourraient présenter une faiblesse

musculaire à un moment de leur vie ou ressentir un stress lié aux manipulations prévues feront l'objet de soins très attentifs afin de pallier ce problème ponctuel si cela s'avère possible ou de les euthanasier avant le développement d'une souffrance dans le cas contraire.

In fine, notre projet devrait permettre de découvrir de nouveaux mécanismes impliqués dans le développement et le fonctionnement musculaire, et possiblement, d'offrir des pistes thérapeutiques pour corriger tout ou partie des problèmes musculaires rencontrés dans des myopathies congénitales.

16335 Le Syndrome de Down (SD) aussi appelé Trisomie 21 (T21), est dû à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Ce syndrome touche 1 nouveau-né pour 600-800 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de dysmorphies ou malformations. Parmi les gènes candidats à l'apparition de ces symptômes, un gène présent sur le chromosome 21 humain et donc en 3 copies chez les sujets porteurs de la T21, est aujourd'hui une des cibles privilégiées pour le développement de traitements thérapeutiques. Les études de ce gène chez la souris ont démontré son implication dans le développement crânio-facial et le développement et la maturation du cerveau. En effet, les souris ayant une copie supplémentaire de ce gène présentent des anomalies crânio-faciales ainsi qu'une altération des capacités d'apprentissage et un déficit de la mémoire similaire à celles observée dans la T21.

Arriver à déplacer de quelques dizaines de points le quotient intellectuel des patients atteints de la T21 leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. L'objectif de la recherche sur la T21 est donc de mettre au point un traitement améliorant les fonctions intellectuelles des patients.

Des collaborateurs proposent des composés ayant la propriété d'améliorer les capacités cognitives qui sont altérées dans cette pathologie en ciblant l'activité de notre protéine d'intérêt. Durant ce projet, nous souhaitons déterminer le composé parmi 2 candidats (composés 1 et 2) qui se révélera le plus efficace en termes de restauration des fonctions intellectuelles. Ces composés seront synthétisés et testés pour l'ADME pharmacologique (administration, distribution, métabolisation et excrétion) par nos collaborateurs. Ces composés seront ensuite administrés par notre équipe à des souris modèles de T21 et à des souris sauvages dans le but de s'assurer qu'ils n'ont pas d'effet toxique. Les souris traitées feront l'objet de différents tests comportementaux afin de détecter une amélioration de leurs performances cognitives. Par la suite, le composé induisant la meilleure amélioration des performances intellectuelles des souris trisomiques, sera testé sur un modèle de rat de la trisomie 21.

REPLACEMENT : L'utilisation de la souris et du rat dans cette étude est justifiée par le fait que les anomalies à observer (altération des capacités d'apprentissage et déficit de la mémoire) nécessitent un modèle vivant et suffisamment proche de l'homme pour pouvoir être transposées à l'espèce humaine. De plus, sachant qu'il existe des différences inter-espèces il est intéressant de comparer les résultats entre les 2 organismes afin de généraliser les résultats si ces derniers sont similaires.

RAFFINEMENT : Les animaux bénéficieront d'un suivi quotidien à partir du début de leur traitement jusqu'à la fin de l'expérience. Et dans le cas où les animaux présenteraient des signes de souffrance, de mal-être, ou de douleur, ils seront exclus des analyses et soignés ou euthanasiés selon leur état.

REDUCTION : Pour ces tests, des rongeurs mâles et femelles seront utilisés à partir de 12 semaines, âge équivalent au jeune adulte. Nous utiliserons et testerons les deux composés sur les deux sexes afin de vérifier qu'il n'y a pas de différence entre mâle et femelle. De plus, le traitement sera aussi effectué sur des animaux sauvages dans le but de vérifier qu'il n'y ait pas d'effet toxique.

Le test statistique utilisé sera le test de Student pour des groupes non appariés avec comparaison de moyennes des différents groupes à une constante spécifiée, ici 50% correspondant à une performance au hasard. Entre 12 à 16 animaux par groupe sont nécessaires pour avoir une puissance statistique suffisante.

Dans un premier temps, nous aurons besoin de 6 groupes d'études afin de discriminer le meilleur des deux composés pharmacologique testés sur 19 jours de traitements :

- Souris contrôles sauvages non traitées, n = 16
- Souris contrôles sauvages traitées avec le composé 1, n = 16
- Souris contrôles sauvages traitées avec le composé 2, n = 16
- Souris contrôles trisomique non traitées, n = 16
- Souris trisomiques traitées avec le composé 1, n = 16
- Souris trisomiques traitées avec le composé 2, n = 16

Dans un second temps, il nous faudra 4 groupes de souris supplémentaires pour tester la meilleure des molécules (X) sur 12 jours de traitements :

- Souris contrôles sauvages non traitées, n = 16
- Souris contrôles sauvages traitées avec le composé X, n = 16
- Souris contrôles trisomique non traitées, n = 16
- Souris trisomiques traitées avec le composé X, n = 16

Dans un troisième temps, il nous faudra 4 autres groupes afin de tester le meilleur des deux composés sur un autre modèle rongeur de la trisomie 21, le rat :

- Rats contrôles sauvages non traités, n = 16
- Rats contrôles sauvages traités avec le composé X, n = 16
- Rats contrôles trisomique non traités, n = 16
- Rats trisomiques traités avec le composé X, n = 16

Sachant que cette étude nécessite au total 14 groupes d'études par sexe (10 groupes de souris et 4 groupes de rats avec n = 16 à chaque fois), il nous faudra donc 448 animaux au maximum dont 224 mâles et 224 femelles (maximum de 16 individus par groupe et par sexe, sachant que l'on a n = 10 groupes x 16 individus x 2 sexes = 320 souris et n = 4 groupes x 16 individus x 2 sexes = 128 rats).

16336 Les tumeurs de vessies sont les quatrième tumeurs en termes d'incidence chez l'homme et les neuvièmes chez la femme dans les pays industrialisés. On distingue les tumeurs n'ayant pas envahi le muscle, les TVNIM et les tumeurs ayant envahi le muscle, les TVIM. Les TVNIM récidivent fréquemment mais évoluent rarement vers des formes agressives et sont ainsi de bon pronostic. Les TVIM, sont traitées par ablation de la vessie, cystectomie, associée ou non à une chimiothérapie. Malgré ce traitement environ 50% des patients décéderont dans les 5 années suivant le diagnostic. Il est donc important de mieux comprendre la carcinogénèse des tumeurs de vessie afin d'identifier de nouveaux traitements particulièrement pour les TVIM.

Des mutations d'un récepteur pouvant jouer le rôle d'un oncogène potentiel ont été mises en évidence dans 75% des TVNIM et 15% des TVIM. Pour les TVIM, ces mutations sont associées à un sous-groupe de tumeurs, les tumeurs lumorales papillaires, peu sensibles à la chimio- et l'immuno-thérapie. L'objectif de nos travaux est de comprendre les mécanismes d'action de ce récepteur muté afin de proposer de nouveaux traitements ou combinaisons de traitements qui pourraient améliorer les traitements en évitant l'apparition de résistances qui sont observées en cliniques lors d'un traitement contre des récepteurs de la même famille.

Des expériences *in vitro* (culture cellulaire) ont permis d'obtenir des résultats très prometteurs corroborant nos hypothèses de travail. Nous avons pu montrer le rôle oncogénique majeur du récepteur muté et de ces voies de signalisation dans les tumeurs de vessie et identifier des mécanismes de résistances aux traitements ciblant ce récepteur. Nous avons également pu montrer l'efficacité de certaines nouvelles combinaisons de traitements pour les tumeurs présentant des mutations de ce récepteur.

Nous avons identifié la surexpression d'un autre récepteur comme mécanisme de résistance aux traitements dirigés contre cette famille et nous avons montré *in vitro* dans des modèles cellulaires dérivés de tumeur de vessie et exprimant le récepteur muté qu'une combinaison de molécules ciblant les deux récepteurs présentait des effets synergiques. Cependant, ces études permettent l'obtention de résultats partiels liés aux contraintes de l'expérimentation sur des modèles cellulaires *in vitro*. En

effet, ces modèles cellulaires ne permettent pas de tenir compte des interactions avec le stroma ou de l'angiogenèse tumorale qui sont des paramètres cruciaux lors du processus tumoral. Nous souhaitons donc développer des modèles *in vivo* permettant d'intégrer ces paramètres pour tester les molécules sélectionnées.

Nous utiliserons deux modèles de souris pour tester les traitements : un modèle de xénogreffes de lignées cellulaires et un modèle de tumeurs de patients (PDX) chez des souris immuno-déficientes. Afin de s'assurer de la reproductibilité et de la spécificité des traitements, 4 modèles présentant une mutation du récepteur et 2 modèles contrôles qui présentent une faible expression du récepteur non muté seront utilisés dans cette étude. Nous utiliserons 180 souris pour cette partie du projet.

Pour comprendre les mécanismes moléculaires mis en œuvre lors de la formation de tumeurs de vessie induites par les mutations de ce récepteur, nous utiliserons un modèle de souris transgéniques qui ont l'avantage de développer des tumeurs de vessie *in situ*. Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle de cet oncogène dans les tumeurs de vessie et probablement l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous développerons également des modèles *in vitro* de type organoïdes ou lignées cellulaires à partir de ces tumeurs de vessie murines qui permettront par la suite de réaliser des études pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* et de limiter l'utilisation de ce modèle transgénique. Nous utiliserons 224 animaux pour cette partie du projet.

L'ensemble de notre projet contribuera à une meilleure compréhension de la carcinogenèse des tumeurs de vessie induite par les mutations de ce récepteur et des mécanismes moléculaires associés. Il devrait également permettre d'identifier des marqueurs de diagnostics et de nouveaux traitements potentiels.

Le nombre de souris pour l'ensemble du projet est de 404 et est ajusté au plus bas mais compatible avec l'obtention d'un nombre suffisant de tumeurs pour une caractérisation précise de ces dernières et avec l'identification de nouveaux traitements. Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, et exploiter au mieux les prélèvements, des informations seront obtenues au niveau phénotypique et moléculaire à partir du même animal (Réduction)

Les tumeurs se formant dans la vessie des souris transgéniques sont de très petite taille et restent localisées à la vessie. Ce phénotype n'entraîne ainsi pas de risque pour le pronostic vital des souris qui sont systématiquement étudiées à 20 mois. Les xénogreffes sont mesurées deux fois par semaine. En accord avec la réglementation internationale dans le domaine de la cancérologie, une surveillance continue des souris formant des tumeurs sera effectuée et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

16337 L'immunothérapie est une approche thérapeutique qui agit sur le système immunitaire d'un patient pour lutter contre sa maladie. Dans le cas du cancer, elle ne s'attaque pas directement à la tumeur, mais stimule les cellules immunitaires impliquées dans sa reconnaissance et sa destruction. Dans certains cas cette thérapie n'est pas suffisante pour induire des réponses anti-tumorales et traiter la totalité des patients. Par contre, d'autres voies du système immunitaire peuvent jouer un rôle critique dans le traitement du cancer. La compréhension des mécanismes activés dans ces voies ainsi que la détermination des cellules immunitaires impliquées sont nécessaires. Dans ce projet, nous identifierons les mécanismes de stimulation d'une voie récemment identifiée qui induit une réponse anti-tumorale efficace et la possibilité d'agir en synergie avec l'immuno et/ou la chimio thérapie pour détruire les tumeurs.

Ce projet découle de résultats obtenus *in vitro* à l'aide notamment de lignées cellulaires en culture qui ont étudié cette voie particulière d'activation du système immunitaire innée et permis d'évaluer *in vitro* des thérapies agissant sur cette voie. Ces traitements doivent être maintenant évalués dans un système plus physiologique représentant un organisme vivant intégré tel que la souris. Cette étape de développement préclinique 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.

Toutes les souris transgéniques utilisées dans ce projet sont cliniquement normales que ce soit pendant le développement embryonnaire ou à l'âge adulte. Elles seront greffées avec des cellules tumorales afin de tester des stratégies anticancéreuses.

Nous prévoyons l'utilisation de 540 souris en 5 ans. Ce nombre est réduit au minimum tout en assurant une puissance statistique significative des résultats obtenus.

En accord avec les recommandations internationales en matière de cancérologie, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress, les contraintes et la douleur des animaux grâce à un suivi clinique renforcé et le respect de points-limites.

16338 L'endurance est une discipline équestre très populaire où les couples cavaliers-cheval parcourent de longues distances en extérieur (de 80 à 160 km en une journée pour les épreuves de niveau national et international). Les courses sont divisées en étapes de 20 à 40 km, à l'issue desquelles les chevaux sont abreuvés, refroidis par aspersion d'eau pour faciliter l'évacuation de la chaleur et la récupération, et soumis à un contrôle vétérinaire pour vérifier leur aptitude à poursuivre l'effort. Malgré ce suivi standardisé et rigoureux, les paramètres vétérinaires ont montré leurs limites. Certains chevaux sont probablement éliminés à tort par excès de précaution, tandis que d'autres courent une étape de trop et sont victimes d'accidents en course affectant majoritairement l'appareil locomoteur (entorse, tendinite, myosite, et plus rarement fracture), ou le métabolisme (déshydratation marquée, épuisement, troubles digestifs ...). Pour l'intégrité du sport, comme pour le bien-être et la longévité sportive des chevaux, il est indispensable de trouver de nouveaux marqueurs quantifiables de l'état de santé du cheval et de mettre à disposition des équipes vétérinaires des éléments objectifs d'aide à la décision.

Ces dernières années, de nombreux capteurs embarqués ont été développés pour le suivi sportif et leur usage grandement facilité par le développement d'applications sur smartphone. Si certains systèmes sont validés pour un usage chez le cheval à l'effort, d'autres restent à évaluer et à confronter aux données actuellement relevées sur les courses. Les objectifs de ce projet sont donc d'identifier et de valider de nouveaux marqueurs de l'état de fatigue du cheval pendant les courses d'endurance qui soient sensibles, fiables et non invasifs, issus du monitoring en continu de nombreux paramètres physiologiques et biomécaniques. Ces paramètres mesurés pendant la courses pourraient à terme être utilisés par les vétérinaires pour compléter leurs examens ponctuels au repos par des données sur le comportement du cheval à l'effort.

Le projet comporte deux procédures complémentaires.

La première est une étude préliminaire pour tester les capteurs de température et de mesure de glycémie sur des chevaux à l'effort, et déterminer si les méthodes de refroidissement du cheval en phase de récupération ont une incidence sur les paramètres mesurés. Pour cela, six chevaux d'endurance seront équipés avec ces capteurs et réaliseront un test d'effort standardisé. Des prélèvements sanguins seront réalisés avant, pendant et après l'effort pour mesurer les taux de lactates et de glucose sanguins. Deux protocoles de refroidissement seront utilisés pendant la récupération à l'effort (eau à température ambiante et eau glacée).

La seconde procédure consistera à suivre une centaine de chevaux d'endurance pendant une compétition ; ils seront équipés de capteurs de mesure de température, de la glycémie interstitielle, de la fréquence cardiaque et de la locomotion. Des prélèvements sanguins seront réalisés avant, pendant et après la course pour évaluer le niveau de forme des chevaux et corrélérer ces données avec celles mesurées par les capteurs pendant la course.

Cette étude ne peut être menée que sur des chevaux d'endurance qui constituent l'espèce cible. Il est indispensable de mettre les chevaux en condition d'effort pour reproduire les sollicitations physiologiques que l'on cherche à évaluer. Le nombre de chevaux a été déterminé comme le minimum tenant compte de la variabilité attendue (habituellement sur les courses, il y a 30% de chevaux classés avec de bonne performances, 30 % de chevaux classés avec une moins bonne performance, 30% sont éliminés pour boiterie et 10% pour troubles métaboliques).

Les chevaux utilisés sont des sportifs de haut niveau, soignés et entretenus comme tels, avec des sorties quotidiennes en extérieur et au minimum deux examens visuels par jour lors de la distribution des aliments. Sur les compétitions, ils sont gérés selon le règlement fédéral en vigueur. Les procédures

sont intégrées dans leur programme sportif habituel et ne devraient pas occasionner de stress ou de gêne majeurs. Les chevaux poursuivront leur vie de sportif à l'issue du projet.

16339 Le muscle squelettique a une croissance prodigieuse et possède de grandes capacités régénératrices, qui font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité se trouve un réservoir de cellules souches, les cellules satellites qui jouent un rôle majeur dans la réparation musculaire. Ces cellules reposent à l'état de repos dans le muscle sain et sont capables lors d'une lésion musculaire de s'activer, de se multiplier et de fusionner pour former de nouvelles fibres musculaires. La fonction réparatrice de ces cellules souches peut être altérée dans certaines pathologies musculaires, en particulier dans l'ischémie chronique des membres inférieurs chez l'Homme où la vascularisation des muscles des membres inférieurs est altérée.

Dans cette pathologie, les patients présentent une faiblesse et une atrophie musculaire associées à l'apparition de douleurs à la marche ou au repos à un stade plus avancé. L'atteinte vasculaire ne peut expliquer à elle seule les manifestations cliniques de l'ischémie des membres inférieurs chez les patients. Notre hypothèse est que les capacités cicatricielles des cellules souches du muscle chez les patients atteints d'ischémie des membres inférieurs sont altérées du fait d'une exposition chronique du muscle à l'ischémie. Dans ce contexte, notre objectif principal sera d'analyser les capacités cicatricielles des cellules satellites issues de patients atteints d'ischémie critique des membres inférieurs comparativement à celles de patients contrôles. Pour ce faire, nous souhaitons tester leur capacité à réparer le muscle squelettique et à former de nouvelles fibres musculaires en les greffant *in vivo* dans un muscle préalablement lésé de souris immunodéprimées et irradiées. L'irradiation localisée aux pattes des souris immunodéficientes est un modèle couramment utilisé qui permet de détruire les cellules satellites endogènes de la souris et d'améliorer la prise de greffe des cellules humaines greffées et l'étude de leur capacité régénérative.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. *In vitro*, nous avons déjà validé que les cellules satellites issues de muscles ischémiés humains se multiplient et fusionnent moins que les cellules satellites issues de muscles contrôles. L'étude des capacités cicatricielles des cellules satellites à régénérer un muscle lésé ne peut être appréhendée que sur un organisme entier et ne peut se faire *in vitro*. Pour réduire, nous utilisons le minimum statistiquement possible de souris par groupe et nous favorisons l'utilisation de la patte controlatérale comme contrôle sans lésion. Enfin pour raffiner, on réduit la souffrance des souris en utilisant des sédatifs et analgésiques au cours des procédures. Et nous tentons également d'améliorer la qualité de l'élevage en enrichissant les cages expérimentales.

Cette étude expérimentale chez l'animal fera appel à 144 souris au total réparties sur 3 procédures expérimentales.

16340 Le but de ce projet est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre le rôle physiologique des gènes impliqués, et comment les mutations 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 *in vivo*. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, dans le muscle sain et pendant le développement des pathologies, nous prévoyons d'utiliser 14 modèles murins pour les myopathies congénitales.

Les souris sont requises pour ces expériences pour nous permettre de comprendre les propriétés physiologiques des différents muscles après modification génétique. Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre la pathophysiologie des maladies musculaires. Les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une PE/jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris / 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 euthanasiés prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

Un maximum de 5400 souris sera utilisé (360 souris / lignée, 14 lignées).

16341 Un système immunitaire à part entière est à l'œuvre dans l'intestin, et joue un rôle déterminant dans la tolérance alimentaire, mais également dans la lutte contre les infections intestinales ou encore les cancers de l'intestin. Dans l'ensemble de ces processus, les « cellules présentatrices de l'antigène » jouent un rôle essentiel, en échantillonnant leur environnement (aliments, bactéries, virus, cellules cancéreuses), puis en rapportant ces échantillons (« antigènes ») aux lymphocytes T, les effecteurs du système immunitaire, afin que ceux-ci assurent la tolérance aux antigènes non dangereux (soi, aliments...) ou au contraire éliminent les cellules dangereuses pour l'organisme (infectées ou cancéreuses).

L'échantillonnage de l'environnement par les cellules présentatrices de l'antigène a été largement étudié *in vitro*, mais *in vivo*, les cellules présentatrices de l'antigène réalisent cette fonction dans un environnement extrêmement dense et riche en informations diverses. Leur fonctionnement est donc très vraisemblablement dépendant de chaque tissu. Nous souhaitons comprendre comment elles réalisent l'échantillonnage au niveau de l'intestin grêle, en raison du rôle essentiel de cet organe dans la tolérance alimentaire et le risque infectieux.

Remplacement : Des études *in vitro* ont mis en évidence le rôle régulateur du cytosquelette (le squelette moléculaire de la cellule, qui assure ses mouvements) dans ce processus. La localisation et l'activation du cytosquelette déterminent si les cellules présentatrices de l'antigène migrent, ou échantillonnent l'environnement, ces deux événements étant exclusifs. Par ailleurs, des études *ex vivo* ont également démontré le rôle essentiel de protéines à la surface des cellules présentatrices d'antigène pour leur migration dans l'intestin et leur accès direct au contenu de celui-ci (où se trouvent aliments et potentiels pathogènes). Nous souhaitons étudier la morphologie, la migration, et l'échantillonnage des cellules présentatrices de l'antigène compétentes et déficientes pour ces protéines dans l'intestin, afin de comprendre leur rôle physiologique. Seules des expériences *in vivo* peuvent nous permettre de comprendre comment les cellules présentatrices échantillonnent le contenu de l'intestin pour assurer la tolérance alimentaire et la défense contre les pathogènes.

Réduction : Nous comparerons la morphologie et la migration des cellules présentatrices de l'antigène dans l'intestin grêle de souris sauvages et de souris mutantes par microscopie bi-photonique. La microscopie bi-photonique est un outil puissant qui nous permettra d'analyser un nombre réduit de souris et d'obtenir des résultats d'une grande valeur. Pour cela, une chirurgie fine sans réveil est réalisée pour exposer l'intestin et l'observer au microscope en conditions physiologiques. Cette méthodologie est la seule permettant d'appréhender ce processus complexe *in vivo*, dans les conditions physiologiques du tissu.

Raffinement : Les souris sont anesthésiées pendant toute la durée de la procédure, et un analgésique est utilisé pour limiter les dommages lors de l'imagerie. Il s'agit d'une procédure sans réveil.

Ce projet inclut 20 souris au total, 10 de chaque lignée transgénique qui nous donneront des informations concernant les dynamiques d'échantillonnage et de migration des cellules présentatrices de l'antigène dans l'intestin grêle.

16342 Dans un projet précédent nous avons pu montrer l'efficacité d'un traitement par thérapie dynamique qui consiste à injecter une molécule photosensibilisante et à l'activer avec une source lumineuse. Une fois activée, la molécule photosensibilisante va produire des molécules toxiques pour les cellules tumorales qui vont mourir entraînant une diminution du volume tumoral. Cette efficacité, sur la diminution du volume des tumeurs rétinienes (rétinoblastomes) en utilisant un modèle de souris transgénique, est très bonne puisque la tumeur ainsi traitée a totalement disparu. Cette preuve d'efficacité obtenue, nous avons dû rechercher une formulation de la molécule compatible avec la clinique avant d'aller plus loin dans nos expérimentations. C'est pourquoi une recherche de formulation a été entreprise et deux nouvelles formulations ont été identifiées. Nous souhaitons maintenant tester

l'efficacité de la molécule photosensibilisante (photosensibilisateur) avec ces deux formulations (excipients compatibles avec la clinique) en utilisant ce modèle transgénique. La photosensibilité cutanée du photosensibilisateur est également testée afin de pouvoir protéger les patients de la lumière si besoin.

Ce modèle de rétinoblastomes a été créé à partir de souris transgéniques pour lesquelles l'ajout d'un gène entraîne l'apparition de rétinoblastomes (tumeurs rétinienne) dans les deux yeux des souris. Ce modèle de tumeur oculaire chez la souris présente plusieurs avantages : il permet de mimer le cancer des patients avec l'apparition de tumeurs dans la rétine, les tumeurs se développent spontanément lorsque la souris est porteuse du transgène ce qui nous permet de les suivre et de les traiter très précocement.

Même si, dans les pays développés, la plupart des enfants 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. Nous voulons donc trouver de nouveaux traitements comme la photothérapie dynamique pour pouvoir conserver au maximum les yeux des patients (éviter l'énucléation) et guérir leurs cancers. La molécule avec les deux nouvelles formulations que nous développons doit être évaluée pour connaître son efficacité antitumorale au niveau de l'œil et sa toxicité potentielle au niveau de la peau ce qui permettra de limiter l'exposition à la lumière naturelle des patients durant le traitement.

Ces évaluations d'efficacité et de toxicité de la molécule avec ces deux nouvelles formulations ne peuvent être faites que sur un organisme entier et ce modèle de rétinoblastome mime bien la pathologie chez l'enfant. Cette molécule photosensibilisante avait déjà été validée sur des lignées cellulaires de rétinoblastomes (sans animaux).

Nous utilisons plusieurs techniques d'imagerie du petit animal pour permettre la caractérisation de la croissance tumorale, le suivi de la molécule dans l'organisme, son efficacité sur la tumeur ainsi que sa toxicité dans l'œil et au niveau de la peau. Ces techniques d'imagerie du petit animal, nous permettent d'homogénéiser les groupes constitués en s'assurant que chaque souris a bien une croissance tumorale au niveau de chaque œil et 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 réglementations 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.

Au total nous utiliserons au maximum 303 souris issues de l'élevage de ce modèle.

16343 L'obésité et le diabète de type II connaissent une progression significative et synchrone depuis 30 ans de sorte que la pandémie de "diabesity" actuellement observée au niveau mondial constitue un réel enjeu de santé publique. Des études récentes ont révélé que des neuropeptides connus pour jouer un rôle crucial dans le contrôle hypothalamique du comportement alimentaire sont aussi exprimés dans les îlots pancréatiques, suggérant que les neuropeptides hypothalamiques pourraient servir de lien entre l'homéostasie énergétique et glucidique, et constituer des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'obésité associée au diabète de type II.

Le 26RFa est un neuropeptide hypothalamique découvert en 2003, et qui a été identifié comme le ligand endogène d'un récepteur humain orphelin, le GPR103. Le 26RFa stimule fortement la prise alimentaire chez les rongeurs, et cette activité orexigène du neuropeptide est renforcée chez les animaux soumis à un régime riche en graisse. L'expression du 26RFa est augmentée chez les souris et rats obèses. L'ensemble de ces observations suggère que le 26RFa pourrait jouer un rôle important dans le développement et le maintien de l'obésité.

Des travaux récents, ont révélé que les taux plasmatiques de 26RFa étaient corrélés au statut énergétique et pathologique des individus (obésité, diabète) et que sa sécrétion pourrait être régulée par le glucose ingéré. A l'appui de cette hypothèse, une quantité importante de 26RFa a été détectée dans la paroi de l'estomac, du duodénum, du colon et de l'iléon. Il a aussi été montré que le récepteur du 26RFa (GPR103) est exprimé par les cellules β . L'ensemble de ces observations suggère que le 26RFa pourrait être un nouvel acteur de la régulation de la glycémie et la compréhension de son rôle

et de ses mécanismes d'action pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement du diabète de type II.

Dans ce contexte, nous souhaitons étudier le rôle du 26RFa dans la régulation centrale et périphérique de la glycémie. Ce projet s'articulera autour de deux axes principaux et complémentaires :

- d'une part, la caractérisation de la régulation de l'expression du 26RFa par les stimuli métaboliques et hormonaux aux niveaux périphérique et central,
- d'autre part, l'analyse de l'effet du 26RFa sur la régulation de l'homéostasie glucidique.

Seule l'utilisation d'un modèle mammifère intégré, donc *in vivo* chez l'animal entier, nous permettra de comprendre, de façon globale, la régulation et le rôle de ce neuropeptide et d'établir des comparaisons pertinentes avec les données que nous avons obtenues chez l'homme. Pour cela, la souris présente de nombreux avantages :

- ce modèle animal est largement utilisé pour les études de physiologie permettant une comparaison aisée de nos données avec celles d'autres équipes ;
- le modèle murin permet l'obtention de lignées génétiquement modifiées, nécessaires pour comprendre l'implication de facteurs précis dans des processus physiologiques. Ainsi, nous disposons depuis peu d'une lignée de souris invalidée pour le gène du 26RFa (lignée 26RFa-KO) qui sera un atout majeur pour comprendre le rôle du 26RFa dans la régulation de l'homéostasie glucidique ;
- la souris est facilement élevée en animalerie : taille et coûts d'entretien réduits, fortes performances reproductives.

La réalisation de l'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation de 1155 souris mâles dont 1011 seront issues de la lignée C57Bl/6J et dédiées à l'étude du rôle du 26RFa dans la régulation centrale et périphérique de la glycémie en condition physiologique. 144 souris mâles seront issues de la lignée 26RFa-KO et permettront d'évaluer l'effet de l'absence de 26RFa sur la régulation de l'homéostasie glucidique.

Au cours de ce projet, nous appliquerons la règle des 3 R afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, les processus physiologiques étudiés seront analysés sur des lots de 12 souris par condition de traitement. Ces effectifs nous assureront d'obtenir des données statistiquement analysables. L'effectif des groupes d'animaux pourra être diminué à 10 lors des études concernant la régulation du 26RFa tout en conservant des données statistiquement fiables. De plus, les procédures, n'impliquant pas d'effet néfaste à long terme, pourront être menées successivement sur les mêmes animaux intercalés avec des périodes de repos au cours desquelles les paramètres physiologiques et le bien-être des souris seront régulièrement évalués.

En outre, les conditions d'élevage et de manipulation des animaux seront raffinées pour réduire au maximum leur souffrance éventuelle. Ainsi, dans le cas de procédures ayant un impact sévère sur l'animal des mesures permettant de palier le handicap généré seront mises en place. Par exemple, l'ensemble des actes pouvant entraîner une douleur sera réalisé sous anesthésie (locale ou générale) et la douleur au réveil sera traitée par des analgésiques. C'est notamment le cas lors de l'implantation de canules en i.c.v. après laquelle les souris seront étroitement surveillées pour prévenir l'apparition de tout signe de mal-être.

Enfin, certaines procédures nécessitant des prélèvements sanguins importants (OGTT, ivGTT...) ou le prélèvement de structures (explants hypothalamiques et analyse de l'expression hypothalamique de 26RFa) sont classées sans réveil pour éviter de causer des dommages trop importants aux animaux maintenus en vie.

16344 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 de valider la sécurité de paramètres permettant de diviser par deux la durée du traitement avant passage sur l'homme.

Modèle animal et méthode : L'emploi d'animaux est rendu nécessaire car l'influence de la dynamique du flux sanguin sur les transferts de chaleur ne peut être observée avec d'autres modèles expérimentaux et aucun modèle numérique ne permet de représenter certains phénomènes tissulaires. De plus, les paramètres des tissus sont connus avec des incertitudes trop grandes, ce qui limite la précision des calculs numériques. L'étude impliquera 21 brebis dont 9 suivies immédiatement après l'application des HIFU et 12 avec un suivi distant n'excédant pas 90 jours.

La première partie de l'étude concernera 9 sujets répartis en 3 groupes selon la durée de suivi. Elle visera à établir la sécurité de traitements délivrés sur deux veines superficielles par sujet (3R : réduire) à travers des examens visuels réguliers, une nécropsie détaillée, des analyses sanguines et une analyse histologique des veines traitées. Les dommages attendus sont une lésion thermique de la paroi veineuse induisant éventuellement une occlusion et des dommages thermiques aux tissus situés au contact immédiat de la veine, sur une distance de l'ordre du millimètre. La nécropsie permet notamment de s'assurer de l'absence d'embolie pulmonaire.

La seconde partie de l'étude concernera 6 animaux, elle visera à valider en aigu la distance de sécurité vis-à-vis des veines non-ciblées par le traitement permettant de ne pas induire de thrombose veineuse profonde. Elle consistera à délivrer 2 traitements par sujet (3R : réduire) dans le muscle des pattes postérieures, chacun à une distance contrôlée d'une veine. Les veines seront ensuite prélevées pour évaluer en histologie (analyse microscopique de la structure des tissus) si elles ont été endommagées par les traitements. Deux distances seront évaluées à partir de résultats de simulations préliminaires permettant une première estimation des distances de sécurité à observer (3R : remplacer). Les dommages attendus sont une lésion thermique des tissus musculaires visés, sur un volume d'environ un centimètre cube, et éventuellement à une lésion thermique légère des veines si les distances de sécurité étudiées ne sont pas suffisantes.

La troisième partie de l'étude, concernera également 6 animaux. Elle visera à valider de la même manière la distance de sécurité vis-à-vis des nerfs permettant de ne pas induire de perte de sensibilité lors des traitements. Deux traitements seront délivrés par sujet (3R : réduire) dans les pattes postérieures, dans le muscle, chacun à une distance contrôlée d'un nerf. Les sujets seront suivis pendant 7 jours pour laisser le temps aux dommages aux nerfs d'atteindre leur maximum et des examens visuels seront effectués. Des électromyogrammes (examens fonctionnels à l'aide d'électrodes permettant de vérifier le bon fonctionnement des nerfs) seront réalisés avant traitement et avant euthanasie pour évaluer si les nerfs ont été endommagés. Les dommages attendus sont une lésion thermique des tissus musculaires visés, sur un volume d'environ un centimètre cube, et éventuellement des nerfs si les distances étudiées ne sont pas suffisantes.

Deux distances seront évaluées à partir de résultats de simulations préliminaires permettant une première estimation des distances de sécurité à observer (3R : remplacer).

Tous les sujets seront anesthésiés durant l'ensemble de la procédure (3R : raffiner). Ils seront hébergés en groupe et en box de grande taille et auront de l'eau et de la nourriture à volonté.

16345 Notre projet concerne la régulation du transport des protéines et des lipides utilisant des vésicules entre les compartiments intracellulaires. Il s'agit d'un processus essentiel au fonctionnement normal des cellules et qui est dérégulé pendant la formation des tumeurs. Cette régulation du transport est principalement assurée par les GTPases (protéines capables de lier et dégrader le GTP pour fournir de l'énergie nécessaire à ce transport) de la famille RAB. Notre étude porte sur une des protéine RAB de cette famille. Les travaux de notre équipe et d'autres équipes réalisés sur des cellules en culture et des organismes modèles (levure, Drosophile, ver *C. elegans*) ont permis de montrer que cette protéine RAB régule de nombreuses voies de transport. Nous avons aussi montré qu'il s'agit d'une protéine essentielle au développement embryonnaire normal chez la souris. Nous souhaitons maintenant

étudier son rôle dans formation des organes et le fonctionnement de plusieurs d'entre eux (glande mammaire, épithélium intestinal, cerveau, derme/épiderme).

Pour mener à bien ce projet nous estimons avoir besoin de 696 souris pour la durée des 5 années du projet.

Le nombre d'animaux utilisés (incluant les groupes contrôles nécessaires) est ajusté au plus bas mais est suffisamment important pour maintenir la significativité statistique.

Après avoir développé les modèles de souris nécessaire à ce projet, les animaux seront sacrifiés selon les méthodes d'euthanasies réglementaires à différents stades du développement afin d'étudier leurs tissus.

Toutes les précautions seront prises pour minimiser la souffrance, pour exemple : seuls 23 animaux (des 696 nécessaire à ce projet) seront soumis à un acte chirurgical, ils seront anesthésiés et traités, tout au long de la procédure, avec des analgésiques.

En accord avec les recommandations internationales 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.

16346 Le cancer est une maladie qui touche l'ensemble de la population et qui est, encore aujourd'hui, un véritable fléau pour la société. Dans notre équipe de recherche, nous nous intéressons plus particulièrement au cancer touchant les enfants. Notre travail consiste tout d'abord à comprendre les mécanismes conduisant à l'apparition du cancer afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans le but d'étudier ces mécanismes, nous utilisons des modèles mimant ces tumeurs. Ces modèles peuvent s'étendre de la cellule tumorale en culture jusqu'à l'utilisation de modèles animaux. Nos dernières études nous ont permis d'identifier 4 stratégies thérapeutiques prometteuses pour le traitement d'un cancer pédiatrique du cerveau, le Médulloblastome. Tout d'abord, nous avons montré, par des études bioinformatiques, l'importance de différents gènes dans le développement de ces tumeurs cérébrales. De plus, nous avons mis en évidence, dans des systèmes de culture de cellules tumorales *in vitro*, que ces 4 stratégies thérapeutiques, basées sur l'utilisation de nouvelles molécules, induisent la mort des cellules tumorales. Il nous est maintenant nécessaire de pouvoir étudier l'efficacité de ces approches *in vivo* en utilisant pour modèle, la souris. Nous utiliserons également les jeunes souris ce qui nous permettra de réaliser notre étude dans un contexte « pédiatrique ». Ainsi, dans le cadre de ces projets, nous étudierons, chez la souris, l'effet de différents traitements sur le développement et la croissance tumorale de différents modèles de Médulloblastome. Pour cela, des cellules tumorales seront injectées chez la souris, puis les traitements seront appliqués. Le développement tumoral sera suivi soit par imagerie, soit par mesures des volumes tumoraux.

Pour chaque expérimentation, le nombre de souris a été choisi de façon à limiter le nombre d'animaux utilisés, tout en permettant d'obtenir des résultats exploitables et statistiquement significatifs. Nous prévoyons ainsi d'utiliser 1522 souris maximum sur 5 ans afin d'évaluer l'efficacité de ces 4 stratégies thérapeutiques.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux. En effet, des méthodes d'analgésie et d'anesthésie seront utilisées dès que cela s'avérera nécessaire. De plus, la souffrance des animaux pourra être anticipée par l'utilisation de techniques, non invasives, d'imagerie du petit animal, qui permettront d'évaluer la croissance tumorale au cours du temps et ainsi permettre une euthanasie précoce des animaux si cela est nécessaire.

En conclusion, notre travail pourrait apporter une avancée conséquente dans le domaine du cancer du cerveau chez l'enfant.

16347 Ce projet a pour objectif d'évaluer l'immunogénicité de nouveaux candidats vaccins et de traitements anti-infectieux développés en traitements préventifs et/ou thérapeutiques de maladies infectieuses. 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. Ce

projet permet également d'étudier l'immunogénicité de molécules thérapeutiques (Anticorps ; protéine ; petites molécules...). Dans ce cas, la production par l'hôte d'anticorps anti-molécule et leurs impacts sur l'activité de la molécule sont étudiés. Enfin, ce projet vise à donner des informations sur les mécanismes d'action des différents composés testés par l'analyse couplée de la réponse immune, des cytokines et des voies de signalisations induites.

Les essais d'immunogénicité permettent d'évaluer le bénéfice de différentes préparations vaccinales ou de traitements anti-infectieux, d'identifier les composés nécessaires à la formulation étudiée, d'évaluer les nouvelles voies d'administration ou les nouvelles formes pharmaceutiques qui permettent d'améliorer la performance du vaccin ou du traitement anti-infectieux. Enfin, les mécanismes d'action et la caractérisation de la réponse immunitaire doivent être évalués pour comprendre la réponse immunitaire, voire, l'améliorer.

Un test d'immunogénicité consiste à administrer à des animaux un candidat vaccin ou un traitement anti-infectieux, 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 (recherche d'anticorps) et/ou cellulaire (recherche de sécrétions de cytokines).

Ces différentes données précliniques sont un préalable aux essais cliniques et à l'enregistrement du candidat vaccin ou du traitement anti-infectieux et seront incluses dans les différents dossiers réglementaires.

Les espèces utilisées pour ce projet sont la souris, le rat, le cobaye, le hamster, le lapin, le furet et le miniporc. 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, 25 000 souris, 3 000 hamsters, 1 000 rats, 1 000 cobayes, 1 000 lapins, 100 miniporcs et 50 furets 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 substituer les 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 contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé.

L'anesthésie gazeuse à l'isoflurane est recommandée et est appliquée dès que le type de manipulation et l'espèce animale le permettent. Lorsque cela est possible, le mécanisme d'action et la bio-distribution des composés du candidat vaccin ou du traitement anti-infectieux pourront être suivis en cinétique par des techniques de bio-imagerie non invasives.

16348 Notre projet est de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans des maladies dégénératives spécifiques du système neuromusculaire. Nous étudions les maladies dégénératives gravissimes des motoneurons, les amyotrophies spinales (SMA) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Aucun traitement curatif n'est disponible pour ces maladies extrêmement invalidantes et mortelles. Seuls les symptômes sont pris en charge pour alléger les douleurs des patients et limiter la progression des pathologies. De nouvelles approches de thérapie génique pour la SMA sont en cours d'étude. Cependant, les premiers résultats très encourageants montrent que ces traitements ne sont pas curatifs et nécessitent le développement d'autres approches potentiellement complémentaires.

Des résultats originaux récents ont mis en évidence qu'une modulation des activités neuromusculaires par l'exercice physique pouvait être plus ou moins bénéfique en fonction des pathologies et des conditions de réalisation, telles que l'intensité, la durée, ou le type d'exercice (marche, course, nage). Les mécanismes à l'origine de ces effets ne sont pas connus.

C'est donc dans ce contexte que s'inscrit notre projet, dont l'objectif est:

1) d'étudier les mécanismes biologiques impliqués dans les effets bénéfiques de l'exercice physique au cours des pathologies dégénératives neuromusculaires et

2) de mettre au point des approches physiothérapeutiques adaptées à chaque pathologie.

Aucun modèle cellulaire ne permet de répondre à de tels questionnements scientifiques. L'analyse des maladies humaines du système neuromusculaire implique des relations complexes entre les différents tissus concernés (tissu musculaire et tissu nerveux) et nécessite l'utilisation d'organismes vivants, mimant les maladies humaines et répondant aux stimuli de manière la plus proche possible de l'Homme. De plus, dans le cadre de l'évaluation des effets de l'exercice physique, seul un être vivant peut nous permettre de mimer les adaptations complexes observées chez l'Homme.

L'étude utilisera des modèles de souris transgéniques qui miment les pathologies humaines : souris SMA et SLA, par comparaison avec des souris saines. Dans un premier temps, des molécules ou virus génétiquement modifiés permettant l'identification de cellules cibles seront injectés au niveau des tissus neuromusculaires, sous anesthésie générale ou locale pour réduire la douleur. Ces souris seront soumises à des protocoles précis d'exercice de course ou de nage, dans des appareillages dédiés et non dommageables, puis seront euthanasiées. Les tissus cibles seront prélevés et l'identification des mécanismes candidats pouvant être impliqués dans les effets bénéfiques de l'exercice physique sera réalisée grâce à des techniques de biologie moléculaire. Les effets *in vivo* de l'exercice physique seront analysés longitudinalement au niveau comportemental (durée de vie, comportement moteur) et physiologique (métabolisme énergétique).

1398 souris seront utilisées sur 5 ans pour répondre aux questions scientifiques posées. Ce nombre repose sur la constitution de groupes de 6 animaux pour les analyses cellulaires et de 15 animaux pour les analyses comportementales dans nos différentes conditions et à différents âges de la maladie. Ce nombre est minimal et permet le meilleur respect possible de la règle des 3R tout en permettant d'émettre des conclusions validées statistiquement.

De plus, la règle des 3R sera suivie en améliorant le confort des animaux, les souris feront l'objet de raffinement avec enrichissement du milieu (igloo, copeaux), suivi quotidien du comportement en phase symptomatique par l'utilisation de tables d'évaluation comportementale adaptées aux âges des souris et administration d'antalgiques pour alléger les douleurs. Des points-limites pour chaque tranche d'âge, souriceaux ou souris adultes, ont été établis et adaptés à chaque modèle animal. Un score de douleur trop élevé impliquera l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude. Ce projet fondamental et pré-clinique devrait permettre de découvrir de nouvelles approches potentiellement thérapeutiques et d'adapter les prises en charge clinique des patients atteints par ces maladies du système locomoteur. Il favorisera la mise au point de protocoles de physiothérapie précis et adaptés à chaque pathologie et à chaque patient (médecine personnalisée), et permettra aussi de promouvoir l'utilisation de nouvelles molécules protectrices dans ces maladies.

16349 Notre projet est de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans des maladies dégénératives spécifiques du système neuromusculaire. Nous étudions les maladies dégénératives gravissimes des motoneurons, les amyotrophies spinales (SMA), maladies génétiques provoquées par la mutation du gène Survival of Motor Neurons 1 (SMN1), et la sclérose latérale amyotrophique (SLA), maladie sporadique et génétique, dont 15% des cas familiaux sont dus à la mutation du gène Super Oxide Dismutase 1 (SOD1).

Aucun traitement curatif n'est disponible pour ces maladies extrêmement invalidantes et mortelles. Seuls les symptômes sont pris en charge pour alléger les douleurs des patients et limiter la progression des pathologies. De nouvelles approches de thérapie génique pour la SMA sont en cours d'étude. Cependant, les premiers résultats montrent des limites, soutenant le besoin de développer de nouvelles approches complémentaires.

Pour ce faire, nous avons besoin de poursuivre l'étude de ces maladies afin de décrire l'ensemble des mécanismes altérés, de les comprendre et ensuite d'évaluer leur impact potentiel sur la progression de la maladie. En effet, si la SMA et la SLA sont des maladies du motoneurone, elles sont montrées maintenant comme étant des maladies affectant plusieurs autres cellules du système nerveux, voire même plusieurs organes, au point que le métabolisme énergétique apparaît comme très perturbé dans

ces pathologies. Le rôle exact de ces altérations reste encore mal connu ainsi que leur impact sur les maladies.

Enfin, des résultats originaux récents ont mis en évidence qu'une modulation des activités neuromusculaires par l'exercice physique pouvait être bénéfique dans ces maladies, les mécanismes à l'origine de ces effets ne sont pas connus.

C'est donc dans ce contexte que s'inscrit notre projet, dont l'objectif est d'étudier les effets de la modulation de mécanismes biologiques ciblés comme potentiellement bénéfiques au cours des pathologies dégénératives neuromusculaires.

Aucun modèle cellulaire ne permet de répondre à de tels questionnements scientifiques, même s'ils aident à décrypter l'implication de certains mécanismes. L'étude utilisera des modèles de souris transgéniques qui miment les pathologies humaines : souris SMA et SLA, par comparaison avec des souris saines. Dans un premier temps, l'identification de molécules candidates pouvant être impliquées dans les maladies et/ou les effets bénéfiques sera réalisée grâce à des techniques de biologie moléculaire. Les effets de ces molécules candidates seront ensuite testés *in vitro* sur des cultures de cellules de souris et/ou de patients. Seules les molécules ayant les meilleurs effets seront ensuite testées *in vivo* sur les souris SMA, SLA. Les effets *in vivo* des molécules candidates seront analysés longitudinalement aux niveaux comportemental (durée de vie, comportement moteur) et physiologique (métabolisme énergétique).

2121 souris seront utilisées sur 5 ans pour répondre aux questions scientifiques posées. Ce nombre repose sur la constitution de groupes de 6 animaux pour les analyses cellulaires et de 15 animaux pour les analyses comportementales dans nos différentes conditions et à différents âges de la maladie. Ce nombre est minimal et permet le meilleur respect possible de la règle des 3R tout en permettant d'émettre des conclusions validées statistiquement.

De plus, la règle des 3R sera suivie en améliorant le confort des animaux, les souris feront l'objet de raffinement avec enrichissement du milieu (igloo, copeaux), suivi quotidien du comportement en phase symptomatique par l'utilisation de tables d'évaluation comportementale adaptées aux âges des souris et administration d'antalgiques pour alléger les douleurs. Des points-limites pour chaque tranche d'âge, souriceaux ou souris adultes, ont été établis. Un score de douleur trop élevé impliquera l'euthanasie de l'animal avant la fin de l'étude.

Ce projet fondamental et pré-clinique devrait permettre de découvrir de nouvelles approches potentiellement thérapeutiques et d'adapter les prises en charge clinique des patients atteints par ces maladies du système neuromusculaire. Il favorisera la mise au point de traitements par utilisation de nouvelles molécules protectrices dans ces maladies, mais aussi permettra de promouvoir des traitements complémentaires à d'autres thérapies, telles que les thérapies géniques pour la SMA, afin de limiter l'évolution pathologique et d'améliorer la qualité de vie des patients.

16350 L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité d'un traitement de comprimés de vitamine K1 administré par voie orale chez des chiens présentant une intoxication à un raticide.

La plupart des raticides sont des anticoagulants antivitamine K1 dont le mécanisme d'action est de provoquer une hémorragie.

Ces raticides ne nécessitent généralement qu'une seule ingestion pour causer un effet anticoagulant chez les espèces cibles (rongeurs) ainsi que chez les espèces non visées (chats, chiens, chevaux, ruminants, humains) suite à la consommation accidentelle de grains, d'appâts ou d'animaux empoisonnés. Dans le cas d'un empoisonnement accidentel, un traitement antidote existe par utilisation de la vitamine K1. Dans la pratique clinique, un traitement à la vitamine K1 est initiée soit par voie intraveineuse, soit intramusculaire.

La mesure du temps de prothrombine (PT: prothromin time) est le test le plus couramment utilisé pour surveiller l'effet anticoagulant et la durée de traitement antidote à appliquer.

La vitamine K1 sous forme de comprimés de 50 mg a déjà démontré son efficacité systémique dans le traitement des signes cliniques chez les chiens intoxiqués par raticide lorsqu'il est administré quotidiennement après une phase initiale de traitement par voie intraveineuse ou intramusculaire.

L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité d'un traitement de comprimés de vitamine K1 chez les chiens présentant une intoxication à un raticide anticoagulant sans passer au préalable par la phase initiale d'injections intravaveineuses ou intramusculaires d'une forme injectable de vitamine K1.

Le projet consiste à provoquer dans un premier temps un empoisonnement des chiens par administration orale d'un raticide puis à administrer la vitamine K1 par voie orale pendant 21 j consécutifs, suivi d'une période d'observation pendant encore 4 jours (période de réversibilité).

Le nombre de chiens inclus dans le projet est 14.

Concernant la règle des 3R :

- Le nombre d'animaux est réduit au minimum suffisant pour permettre la détection d'effets et effectuer les tests statistiques avec la sensibilité appropriée.
- Les animaux bénéficieront d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger)
- Un protocole d'urgence par voie intraveineuse sera immédiatement appliqué en cas de PT fortement augmentée (i.e. >30 s).

Actuellement, il n'existe pas de méthode alternative permettant de reproduire ce type d'empoisonnement.

Les points limites pour ce projet sont :

- Amaigrissement marqué (>20% par rapport à la première pesée dans l'étude, avant empoisonnement)
- Saignements importants ou signes d'hémorragie interne
- PT élevée (>30s) malgré le traitement d'urgence appliqué
- Signes de douleurs non résorbables

Ces points limites seront applicables pendant toute la durée de l'étude.

Ce projet est classé avec un degré de sévérité sévère compte-tenu de l'isolement prolongé des animaux, indispensable car risque de saignement en cas de bagarre ou de jeu avec d'autres congénères.

16351 Les virus qui s'attaquent aux bactéries sont dénommés bactériophages. La conséquence principale de l'action des bactériophages est la destruction des bactéries. Les bactériophages sont en fait l'entité biologique la plus abondante sur Terre et ils jouent un rôle vital dans la dynamique et l'évolution des populations bactériennes dans l'environnement, y compris au sein des flores bactériennes hébergées par les animaux.

Bien qu'étudiés depuis plus d'un siècle, les bactériophages demeurent une ressource de connaissances biologiques sous-exploitées. En effet, la diversité génétique des bactériophages est telle que ceux-ci utilisent des fonctions originales pour accomplir leur mission destructrice vis-à-vis des bactéries. Certaines de ces fonctions peuvent être exploitées pour développer de nouvelles stratégies antibactériennes, voire de nouveaux antibiotiques.

D'un point de vue chronologique, avant même d'avoir pu séquencer les génomes des bactériophages, ceux-ci ont été utilisés comme outils thérapeutiques pour lutter contre les infections bactériennes, et ceci avant la découverte des premiers antibiotiques. Cette approche thérapeutique, dénommée phagothérapie, n'a finalement pas réussi à s'imposer face aux antibiotiques. Cependant, aujourd'hui les bactéries sont de plus en plus souvent résistantes aux antibiotiques à tel point que certaines infections sont devenues incurables. Cette situation a relancé la recherche sur la phagothérapie.

Les informations nécessaires pour permettre une utilisation raisonnée et raisonnable des bactériophages à des fins thérapeutiques sont largement manquantes. En effet, les données présentes dans la littérature scientifique et médicale sont soit trop incomplètes soit trop anciennes pour répondre aux normes exigées par les autorités sanitaires. Ce projet a pour objectif de fournir les éléments scientifiques tant fondamentaux qu'appliqués pour soutenir le développement de la phagothérapie.

Le bénéfice attendu est donc une meilleure connaissance des paramètres écologiques (impact sur les communautés microbiennes) et thérapeutiques (efficacité et innocuité) de la phagothérapie afin de permettre son utilisation optimale et sans risque chez l'homme.

Pour atteindre cet objectif nous étudierons différents couples bactérie/bactériophage (dont l'identité variera au cours du projet) dans des modèles murins (souris mâles ou femelles âgées de 8 à 12 semaines) en nous focalisant sur deux organes cibles : le tube digestif et l'appareil respiratoire. Un ensemble de 6 procédures expérimentales et 12010 animaux seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Parmi ces 6 procédures, 2 engendrent un degré de sévérité légère concernant un total de 3760 animaux, et 4 engendrent un degré de sévérité modérée concernant un total de 8250 animaux.

Dans les procédures modérées les animaux développeront des infections bactériennes au niveau pulmonaire (difficultés respiratoires) ou digestif (diarrhée).

Les animaux seront observés régulièrement et jusqu'à plusieurs fois par jour lorsqu'ils développeront des infections.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience sera limité au strict nécessaire suivant les conseils d'un biostatisticien. Au cours du développement de ce projet la taille des groupes contrôles lors des répétitions sera réduite sans compromettre l'interprétation des résultats.

Pour raffiner au mieux les procédures, la durée des expériences impliquant des souches pathogènes sera réduite au maximum afin de limiter l'éventuelle souffrance des animaux et de procéder le cas échéant (lors d'atteinte des points limites) à leur mise à mort.

Aucune alternative *in vitro* susceptible de répondre aux questions posées n'existe à ce jour.

16352 Les maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose demeurent la principale cause de décès dans le monde. Il a été démontré que les lipoprotéines de haute densité (HDL), responsables du transport du cholestérol vers le foie où il pourra être éliminé, exercent un large spectre de propriétés capables de limiter les risques d'athérosclérose. L'apolipoprotéine A1 (Apo-A1) qui participe à la structure générale de ces HDL en est la protéine la plus importante qualitativement. L'effet bénéfique de l'ApoA-I a été démontré lorsque cette protéine était surexprimée ou administrée chez des souris. A l'inverse, les souris chez lesquelles ce gène a été supprimé développent des lésions d'athéroscléroses très importantes. Par ailleurs, il a été montré que les souris surexprimant ou n'exprimant pas l'ApoA-I hébergeaient un microbiote (ensemble des micro-organismes) intestinal différent. Compte tenu des études récentes démontrant un rôle essentiel du microbiote intestinal dans le développement de nombreuses pathologies dont les maladies cardio-vasculaires, notre objectif est de déterminer si cette modification du microbiote associée aux différents niveaux d'ApoA1 contribue aux effets observés sur l'athérosclérose. Cette étude, qui fait partie d'un projet international plus large pourrait ainsi déboucher sur de nouvelles voies thérapeutiques de l'athérosclérose en ciblant le microbiote intestinal.

Dans cette étude, le microbiote de souris et d'êtres humains présentant différents niveaux d'apoA-I / HDL sera transplanté chez des souris prédisposées à l'athérosclérose (déficientes en apolipoprotéine E) préalablement traitées aux antibiotiques (ce traitement ayant pour but de détruire le microbiote intestinal de l'hôte). Ces souris recevront ensuite un régime contrôle pendant 16 semaines à l'issue desquelles différentes analyses seront réalisées pour évaluer l'apparition de l'athérosclérose et identifier l'influence des différents microbiotes implantés sur le développement de cette pathologie.

Le projet, portant sur la relation entre l'alimentation, l'hôte et ses bactéries, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Lors de la conception du protocole expérimental nous avons déterminé et réduit le nombre d'animaux au minimum nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le projet prévoit ainsi le recours à 128 souris sur 5 ans (soit 8 groupes de 16 souris). Chaque groupe sera composé de 16 souris ce qui est un minimum pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. L'aspect des souris et leur comportement seront suivis quotidiennement afin de détecter d'éventuels signes de souffrance. Par ailleurs, les souris seront pesées toutes les semaines et des prises ou pertes de poids excessives par rapport au poids de départ constituent les points limites de l'expérimentation. Nous collecterons par ailleurs des fèces au début et à la fin de l'expérimentation. À la fin de la période expérimentale, après un jeûne de cinq heures, du sang sera prélevé puis les souris seront euthanasiées par une méthode réglementaire. Enfin post-mortem, de nombreux tissus et organes (foie, aorte, intestin, rate...) seront prélevés pour réaliser des analyses histologiques et biomoléculaires. Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance

animale n'est attendue dans cette étude. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout de Sopalín (pour faire le nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les souris seront 4 par cage pour éviter l'isolement. 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.

16353 Les troubles de la mémoire peuvent être causés par des maladies neurodégénératives (telles que la maladie d'Alzheimer), des lésions cérébrales liées à un traumatisme crânien, des accidents vasculaires cérébraux ou encore l'épilepsie. Les traitements pharmacologiques associés ont une efficacité limitée, ce qui a conduit par exemple à la révocation de leur prise en charge par la sécurité sociale pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. La stimulation électrique du système nerveux, ou neurostimulation, est une approche alternative qui a montré son efficacité dans le traitement des symptômes de la maladie de Parkinson et de la douleur chronique. En outre, plusieurs essais cliniques sont en cours dans le monde pour étendre son application à d'autres troubles neurologiques, en particulier les troubles de la mémoire et la maladie d'Alzheimer. Différents groupes de recherche clinique ont montré certaines améliorations des capacités de mémoire sur des patients épileptiques implantés avec des électrodes pendant une période d'environ une semaine. En revanche, ces essais cliniques n'ont pas permis de mettre en évidence la meilleure cible thérapeutique ou les paramètres de neurostimulation optimaux pour mener à une augmentation substantielle des facultés de mémoire, en particulier en raison de l'impossibilité de déplacer les électrodes chez ces patients ou bien de tester plusieurs protocoles de neurostimulation. Afin de comprendre précisément les effets de la neurostimulation sur les structures cérébrales impliquées dans les processus mnésiques et d'en optimiser les paramètres pour améliorer les facultés de mémoire, des études pré-cliniques chez l'animal sont nécessaires. Les modèles animaux permettent en effet de positionner systématiquement les électrodes pour cibler les aires cérébrales d'intérêt, ce qui n'est pas possible chez des patients épileptiques qui reçoivent des électrodes implantées pour une raison différente, liée à leur pathologie. De nombreux travaux sur le rongeur ont permis d'étudier en détail les contributions de la formation hippocampique dans les processus de mémoire. En revanche, les modèles rongeurs restent limités pour déterminer la meilleure cible thérapeutique au niveau des réseaux cérébraux à grande échelle, qui diffèrent fortement entre les rongeurs et les primates. Ces réseaux cérébraux à grande échelle impliquent notamment le cortex préfrontal médial. Il a été démontré que les interactions entre le cortex préfrontal médial et la formation hippocampique jouent un rôle majeur dans les processus de mémoire. De plus, une altération de ces interactions est présente dans plusieurs maladies neurodégénératives et troubles neuropsychiatriques.

Le but de ce projet est de tester sur le primate non-humain des protocoles de neurostimulation affectant plusieurs aires cérébrales (en particulier la formation hippocampique et le cortex préfrontal médial) afin d'augmenter les capacités d'encodage et de récupération des informations sur une tâche de mémoire visuo-spatiale (apprentissage par association de paires). La tâche cognitive utilisée est similaire à celle employée chez l'humain pour évaluer des déficits de mémoire épisodique dans la maladie d'Alzheimer. Ces tests seront effectués sur 10 macaques, répartis dans deux groupes d'âge. Ces animaux seront implantés avec des électrodes intra-cérébrales situées dans l'hippocampe, le cortex entorhinal et le cortex préfrontal. Une substance pharmacologique, la scopolamine, sera utilisée pour induire des déficits de mémoire de manière temporaire. Pour analyser les effets de la neurostimulation au niveau des déficits induits par la scopolamine, chaque animal sera son propre contrôle afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, une comparaison entre les deux groupes d'âge sera effectuée, le groupe le plus âgé pouvant être considéré comme un modèle chronique de déficits cognitifs. Des analyses d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) seront également effectuées afin de compléter les tests neurophysiologiques. Enfin, les données collectées serviront de base à l'élaboration de modèles informatiques permettant de déterminer l'effet de la neurostimulation sur les réseaux cérébraux de la mémoire.

Les animaux seront hébergés ensemble, dans une structure spécialement agréée pour l'hébergement et l'utilisation des primates en recherche, disposant d'équipements et de protocoles adaptés au raffinement du milieu pour cette espèce (nourriture variée, jeux pour primates, fond sonore, habituation progressive à l'environnement et à la tâche, ...). Toute intervention nécessaire à l'expérimentation sur

l'animal sera réalisée sous anesthésie locale ou générale et complétée par l'utilisation d'analgésiques afin d'assurer le meilleur confort qui soit. Les points limites seront respectés, ce qui nous amènera à prendre les dispositions qui s'imposent de la façon la plus précoce et la plus adaptée possible. Pour cela, tous les animaux seront surveillés plusieurs fois par jour par nos techniciens animaliers et par les chercheurs formés et habitués à interagir avec ces espèces animales. Cela permettra de discuter au cas par cas des soins à apporter à l'animal en fonction des besoins.

16354 Contexte et objectif

La déficience intellectuelle (DI) affecte entre 2 et 3 % de la population et de nombreuses mutations ont été identifiées dans de nombreux gènes chez les patients. Les questions qui se posent à la communauté en vue d'établir des stratégies thérapeutiques sont dans un premier temps de comprendre quelles sont les fonctions des gènes associés à la DI, comment les mutations affectent ces fonctions et quelles en sont les conséquences sur l'apprentissage et la mémoire. Des travaux antérieurs ont démontré que ces mutations induisent souvent des défauts de plasticité synaptique, c'est-à-dire du fonctionnement des neurones, impactant fortement les capacités cognitives. De nombreux patients présentent également des défauts morphologiques du cerveau comme de la macro ou microcéphalie, une hypoplasie cérébelleuse, une dysgénésie du corps calleux, etc. Ces anomalies morphologiques contribuent à la sévérité de la pathologie.

Une nouvelle lignée transgénique murine a été créée pour nous. Cette lignée porte une des mutations récemment identifiées chez l'Homme conduisant à une déficience intellectuelle sévère, une microcéphalie et une agénésie du corps calleux. Nous souhaitons maintenir cette lignée dans notre laboratoire afin d'explorer chez l'animal par imagerie (IRM) et de façon indolore les défauts d'anatomie cérébrale induits par cette mutation. Nous explorerons également les défauts cognitifs présentés par ce nouveau modèle en réalisant des tests d'apprentissage et de mémoire ainsi que des tests mesurant l'anxiété ou l'interaction sociale. De façon plus globale, ce projet a pour but : 1) de mieux comprendre l'étiologie de la déficience intellectuelle due à des mutations de gènes portés sur le chromosome X observée chez les patients ; 2) de faire le lien entre malformation du cerveau et capacités cognitives.

Avantages et dommages escomptés : Cette lignée de souris transgéniques est un modèle d'une pathologie due à une mutation nouvellement identifiée chez l'Homme et responsable d'une déficience intellectuelle sévère et d'anomalies morphologiques du cerveau. Ce modèle unique permettra de comprendre la sévérité des symptômes associés aux mutations de ce gène. Les premières observations de cette lignée suggèrent que le phénotype induit n'est pas dommageable.

Nombre et type d'animaux utilisés sur 5ans

Nous prévoyons d'utiliser 156 à 230 animaux pendant la durée de 5 ans du projet (78 à 115 souris mutantes de cette lignée et autant de souris issues des mêmes portées de génotype sauvage, comme contrôle).

Conformités avec les exigences 3R : Réduction : Le nombre d'animaux par groupe correspond au minimum nécessaire d'après notre expérience pour une comparaison convaincante entre les deux génotypes. En prenant en compte les variabilités inter-individuelles qui sont assez faibles, nous avons estimé à 8 souris le nombre d'animaux minimum nécessaires par groupe pour faire une analyse statistiquement valide des volumes des différentes zones cérébrales. Pour les expériences de comportement, nous avons estimé à 10 le nombre minimum nécessaire par génotype dans chaque groupe. En cas de variabilité importante, ce nombre de souris sera augmenté à 12-15. Nous utiliserons les tests statistiques adaptés afin de mettre en évidence la significativité de nos résultats en utilisant le moins d'animaux possible. A noter également que dans l'optique de réduire le nombre d'individus par expérience, nous avons planifié de faire plusieurs analyses comportementales sur un même groupe d'animaux.

Remplacement : Nous ne pouvons pas analyser la microcéphalie, l'agénésie du corps calleux ou encore l'impact d'une mutation sur les capacités cognitives sans modèle animal ; Aucune expérience *in vitro* ne peut donner des informations équivalentes.

Raffinement : les animaux sont élevés dans un environnement contrôlé et enrichi. Nous adapterons au mieux nos conditions d'élevage pour favoriser la reproduction et réduire la mortalité péri-natale (séparation des géniteurs, etc.).

16355 L'oreille interne est un organe sensoriel assurant l'audition et l'équilibre. Son fonctionnement repose sur l'activité électrique des cellules ciliées. Ces cellules assurent la transduction du signal acoustique en impulsion électrique au niveau des fibres nerveuses du nerf auditif. Cette transduction met en jeu une synapse particulière dite synapse à ruban. L'objectif de notre travail est de décortiquer les modifications moléculaires de ces synapses lors du vieillissement et lors de certaines mutations génétiques observées chez l'homme.

Pour aborder ces questions, nous utiliserons différentes souches de souris mutées pour des protéines impliquées dans la transmission synaptique auditive, et dont la déficience est responsable chez l'Homme de surdités. Les lignées de souris utilisées ont un fond génétique C57BL/6 et CBAJ (120 souris pour chaque lignée).

Pour notre projet nous nous efforcerons d'appliquer les principes d'une technique expérimentale conforme à l'éthique suivant la règle des 3 R: Réduire, remplacer et raffiner. Pour réduire, nous utiliserons le plus petit nombre d'animaux possible conformément aux limites biostatistiques nous permettant une fiabilité des résultats. Concernant le critère "remplacer", nos études ne peuvent pas se réaliser sur des lignées cellulaires ou des organoïdes *in vitro* car nous étudions les perturbations électrophysiologiques *in vivo* des potentiels auditifs évoqués (PEAs) de la souris (modèle de surdité humaine). Par ailleurs, ces mesures ne peuvent se faire sur des animaux non-mammifères car leur système auditif est trop éloigné de celui de l'homme. Pour raffiner les procédures, c'est-à-dire soulager l'inconfort et le stress des souris avant et pendant les mesures des PEAs, tout d'abord nous hébergeons les souris dans une cage à milieu enrichi (tunnel carton, aspen bois, fibres de papier et abri plastic) dans un local à ventilation, température et éclairage contrôlé. Pendant la mesure des PEAs, l'animal est profondément anesthésié avec une surveillance des points vitaux (fréquence cardiaque et respiration, couleur des muqueuses, température corporelle) et le suivi d'une grille de points limites.

16356 La myopathie de Duchenne est une maladie génétique dans laquelle une protéine, la dystrophine, est absente. Cette maladie 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. Cependant, la piste privilégiée est celle de la thérapie génique. En particulier, la stratégie dite de "saut d'exon thérapeutique" consiste à agir très spécifiquement sur le chaînon intermédiaire entre le code génétique et la protéine (ARN messenger), en éliminant une petite partie de la séquence génétique (exons) pour rétablir une lecture correcte du code génétique et permettre la production d'une dystrophine un peu raccourcie mais fonctionnelle. Cette approche s'appuie sur la production d'oligonucléotides antisens, petits morceaux d'ADN qui viennent se coller spécifiquement sur des zones permettant de générer ce saut d'exon. Afin que ces oligonucléotides puissent atteindre leur cible à partir d'une administration par voie générale, ils doivent être soit vectorisés dans un virus-médicament, soit être pharmacologiquement optimisés pour pouvoir entrer dans les cellules. L'inconvénient du virus-médicament est qu'il induit une réponse immunitaire qui interdit toute réinjection, et l'effet d'une injection unique, fort initialement, s'estompe au fil des mois. Les oligonucléotides "classiques" peuvent être réinjectés régulièrement, mais leur efficacité est médiocre, et pour certains il existe un enjeu de toxicité. Une nouvelle génération d'oligonucléotides, appelés Tricyclo-DNA (TcDNA) a fait ses preuves à la fois sur le plan de l'efficacité et de l'inocuité, *in vitro*, puis *in vivo* dans différents modèles, après injection intraveineuse. Cet oligonucléotide très prometteur est, dans sa version conçue pour un saut de l'exon 51, au seuil de l'essai clinique chez des patients atteints de myopathie de Duchenne éligibles au saut de cet exon (environ 15% des patients). Une étape suivante dans le développement de ce médicament serait de parvenir à l'administrer aux patients par voie orale, ce qui permettrait d'éviter des hospitalisations répétées, et de régulariser davantage les prises, tout en répondant à une demande évidente d'amélioration de la qualité de vie des patients. Cette étude a pour objectif d'étudier la biodisponibilité orale des Tc-DNA en la comparant

à la voie d'administration de référence (intraveineuse) 1) Remplacement. L'étude de l'absorption digestive et de la pharmacocinétique d'un produit nécessite d'être réalisée dans un organisme entier. Des données préliminaires chez la souris suggèrent qu'une absorption digestive est possible. Cette étude a pour objectif de confirmer la biodisponibilité après administration orale de ce produit et de la comparer à une administration IV, dans une espèce de choix pour les études de pharmacocinétique. 2) Réduction: cette étude inclura neuf chiens, dont 3 par groupe, minimum nécessaire pour effectuer un test statistique non paramétrique. Le premier groupe recevra une injection intraveineuse de TcDNA dans les conditions validées et envisagées dans l'essai clinique en préparation. Le second recevra la même dose mais directement dans le duodénum sous guidage endoscopique. Le troisième groupe recevra la même dose totale par voie orale, au moyen de gélules gastrorésistantes administrées deux fois par jour durant sept jours. Des données de pharmacocinétique (prises de sang) et d'excrétion (prélèvements d'urine) seront obtenues et comparées entre les groupes. Des biopsies musculaires seront effectuées avant et après traitement, afin de contrôler la présence du Tc-DNA dans le tissu cible, et de vérifier l'expression de la dystrophine. 3) Raffinement. Les biopsies musculaires seront réalisées sous anesthésie générale et avec une analgésie adaptée. Les chiens seront hébergés ensemble pendant la durée du protocole. Ils disposeront de jeux, plateformes, lieux de couchage. Des interactions fortes avec l'Homme (caresses, jeux) seront maintenues quotidiennement. Nous n'attendons pas de dommages inhérents à cette étude sur les animaux.

16357 Ce projet a pour objectif d'évaluer la pathogénicité des agents infectieux (virus/toxine) entrant dans la fabrication de vaccins destinés à l'Homme. Ces tests de contrôle qualité assurent la mise sur le marché de lots de vaccins conformes aux normes d'innocuité et de sécurité définies réglementairement.

Les tests de contrôle de pathogénicité 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 la présence d'un agent infectieux mal inactivé ou à la persistance d'un effet toxique, et d'étudier sa virulence. Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur chaque lot de vaccins produits.

Les évaluations sont faites sur des souris et des cobayes. Suite à l'injection du produit testé les animaux peuvent présenter des signes cliniques. Dans certains cas des points limites spécifiques sont définis. La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie non attendus est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire. Le degré de sévérité est considéré comme modéré pouvant aller jusqu'à sévère pour les souris. Il est sévère pour les cobayes.

Ce projet pourra engendrer l'utilisation d'au maximum 69500 souris et 50 cobayes sur une période de 5 ans. Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel pour chacun de ces tests conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux utilisés est euthanasiée selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Ethique. Une petite partie des animaux peuvent être réutilisés pour des besoins de formation dans le respect des exigences réglementaires.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : Il n'existe pas à ce jour de méthode alternative au recours à l'animal selon les exigences réglementaires de tous les pays de destination pour les tests (procédures) du présent Projet.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période.

Raffinement : Les animaux sont hébergés dans des cages contenant des enrichissements, dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé.

En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

16358 Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux propres constituants de l'organisme. Les causes sont multiples : génétique, environnemental (agents infectieux, agents toxiques, médicaments) et hormonal. Une meilleure compréhension de ces causes est nécessaire pour améliorer les traitements. Plus de 80 maladies auto-immunes sont actuellement décrites. Elles représentent la 3ème cause de morbidité dans les pays développés et affectent 5 à 7% de la population. Le lupus érythémateux disséminé/systemique (LED) est une maladie auto-immune chronique responsable d'atteintes tissulaires multiples (peau, reins, poumons) avec une sévérité très variable entre individus. Bien que de nombreuses anomalies de l'immunité aient été caractérisées la physiopathologie du LED reste mal connue car complexe. La nouvelle lignée de souris utilisée dans ce projet constitue un modèle unique d'étude de la maladie humaine car elle présente : 1) certains aspects de la maladie lupique mais pas d'autres ce qui permet d'étudier sa complexité génétique ; 2) une hypertrophie des ganglions lymphatiques et de la rate dues à une accumulation de lymphocytes T auto-immuns ; 3) des quantités élevées en auto-anticorps responsables de lésions rénales qui, chez l'Homme, sont la complication majeure du LED ; 4) des taux sanguins anormalement élevés de médiateurs de l'inflammation ce qui en fait un modèle de choix d'étude de leur rôle dans le développement du LED ; 5) comme dans l'espèce humaine, les femelles sont plus atteintes que les mâles. D'autre part, cette lignée ne présente pas d'immunodéficience et elle est capable de combattre efficacement une infection. Chez les patients lupiques, la sévérité des atteintes tissulaires est contrôlée par des corticoïdes et/ou des immunosuppresseurs. Cependant, leur utilisation au long cours altère les réponses immunitaires engendrant un risque infectieux important. Les effets indésirables de ces médicaments incitent à rechercher de nouveaux traitements. Etant donné qu'il est impossible de reproduire *in vitro* la complexité des interactions cellulaires à l'œuvre lors des réponses immunitaires normales ou pathologiques, l'élevage de cette lignée de souris nous permettra 1) d'analyser les mécanismes responsables des processus inflammatoires physiologiques et pathologiques; 2) de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (études précliniques). A ce jour, l'animal de laboratoire demeure le seul recours fiable et pertinent d'étude, à l'échelle de l'organisme, des mécanismes responsables du développement de maladies affectant le système immunitaire. Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R. Pour le « Remplacement », l'utilisation d'un modèle animal reste, dans notre cas, essentiel puisque l'étude des maladies inflammatoires et auto-immunes ne peut se faire que sur un organisme vivant entier. Plusieurs niveaux de complexité sont nécessaires, impliquant des interactions entre les cellules immunitaires et différents organes, qui ne peuvent pas être reproduits *in vitro* ou *in silico*. Pour la « Réduction » : le nombre d'animaux utilisé se limitera au minimum nécessaire en se basant sur nos études précédentes qui ont permis d'optimiser la quantité d'animaux à utiliser. Ainsi, 720 souris seront nécessaires dans les cinq prochaines années pour réaliser ce projet et pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. De plus, l'utilisation à des fins expérimentales des souris ayant servis à la reproduction permettra de réduire le nombre d'animaux à élever. Comme il existe un fort dimorphisme sexuel dans le développement de la maladie, nous élèverons à part égale des mâles et des femelles. Comme chez l'homme, la maladie auto-immune développée par cette lignée de souris se caractérise par une sévérité variable entre individus du même âge et une évolution au cours du temps difficilement prédictible car se manifestant, selon l'individu, soit par des phases de poussées, durant lesquelles les symptômes s'intensifient très rapidement soit par des symptômes constants d'évolution lente au cours du temps. Les souris seront donc sorties de l'élevage à différents âges (3, 5 ou 8 mois) afin de disposer pour l'expérimentation d'animaux à différents stades d'avancement de la maladie. Ceux-ci seront connus au moment de l'expérimentation grâce à l'établissement au cours de l'élevage d'une grille de scores (échelle 0 à 4). Pour le « Raffinement » : le suivi clinique des souris est réalisé quotidiennement. Il est renforcé vers l'âge de 5 mois avec le développement de la pathologie dont la sévérité est connue grâce à une grille de scores. Le score 4 se caractérise par une amplification massive de la taille des ganglions lymphatiques (cervicaux, axillaires, inguinaux) mais sans perte de mobilité de l'animal. L'apparition et le développement de la douleur sont quantifiés sur la base d'expressions faciales à l'aide d'une grille de scores (échelle 0 à 3). Les conditions d'hébergement sont optimisées pour réduire le stress des animaux : maintien des animaux en groupe et enrichissement des cages avec des copeaux de bois compactés et/ou du coton. En particulier, les femelles et les mâles isolés sont regroupés dès qu'ils présentent des augmentations de volume des ganglions lymphatiques visibles sans palpation car ils

perdent généralement toute agressivité avec le développement de la pathologie. Des aliments humidifiés sont ajoutés aux cages dès l'apparition de signes d'amaigrissement $\geq 10\%$ du poids initial afin de limiter la perte de poids. Le point limite est défini par les critères suivants : perte de poids $\geq 15\%$, douleur intense (score 3) ou anomalies du comportement (prostration/dos courbé, perte d'activité de toilettage, difficulté à se déplacer). L'élevage de cette lignée de souris permettra une meilleure compréhension de l'étiologie du LED et donc une amélioration de l'efficacité des traitements.

16359 Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche fondamentale et a pour but d'étudier des maladies neurologiques qui touchent le fonctionnement du cerveau, notamment la maladie d'Alzheimer (MA) et la Trisomie 21 (T21). Un des signes précoces communs à la MA et T21 est la mort des neurones dans la structure cérébrale impliquée dans la régulation des fonctions cognitives, telles que la mémoire, l'apprentissage et l'attention. La mort de ces neurones perturbe les connexions dans le cerveau et en conséquence peut provoquer des problèmes cognitifs. Jusqu'à ce jour, les mécanismes de ce phénomène sont peu connus. Afin de mieux comprendre le lien entre la neurodégénérescence et l'apparition, puis la progression de démences, nous proposons dans ce projet d'étudier chez les modèles animaux de ces 2 maladies, les connexions entre les structures cérébrales impliquées dans la cognition (l'objectif 1). Pour cela nous réaliserons des injections, dans le cerveau d'animaux des deux modèles, d'une substance qui permettra de visualiser les connexions neuronales. Cette procédure chirurgicale sera effectuée sous anesthésie générale. Nous aimerons également effectuer chez ces deux modèles animaux le test de l'apprentissage avec une approche pharmacologique (l'objectif 2) afin d'évaluer s'il est possible d'améliorer la cognition en utilisant un traitement pharmacologique.

Tenant compte du principe de REDUCTION, nous utiliserons un total de 480 souris. 6 individus par groupe (génotype/sexe/âge) pour l'objectif 1 et 12 individus par groupe (traitement/génotype/sexe/âge) pour l'objectif 2 sont requis pour obtenir une puissance statistique suffisante afin de conclure à un phénotype ou non. Dans le but de maximiser les animaux produits et de prendre en compte une éventuelle dysmorphie sexuelle, nous utiliserons dans notre étude des mâles et des femelles. Les données obtenues sont généralement de distribution normale, la statistique utilisée sera un test ANOVA avec test de Turkey en post-hoc.

REMPACEMENT: L'évaluation de la perte de mémoire (processus faisant intervenir plusieurs régions du cerveau et plusieurs organes sensoriels en particulier) requière l'étude d'un organisme vivant dans son intégrité et sa globalité et il n'existe pas de méthode autre que l'étude *in vivo* qui nous permette de répondre à la problématique posée. La souris est une espèce physiologiquement et génétiquement proche de l'Homme dans laquelle nous pouvons réaliser des manipulations génétiques pour obtenir des modèles de pathologies humaines.

RAFFINEMENT : Afin de réduire la douleur possible et de diminuer au maximum l'inconfort possible au cours de chirurgie et en post-opératoire nous allons utiliser un traitement adapté : 1) une anesthésie générale (un mélange de kétamine et de médétomidine); 2) une désinfection de la zone opératoire avec de la vétidine ; 3) de la lidocaïne en gel sur la zone de fixation de l'animal sur le cadre de stéréotaxie ; 4) un gel oculaire afin de réduire la sécheresse cornéenne lors de l'anesthésie ; 5) un analgésique sera administré deux fois par jour (le matin et le soir) pendant 48h après la chirurgie. Afin de diminuer le stress après la chirurgie, les souris seront placées dans leur cage sur une plaque chauffante, jusqu'à leur réveil. Les cages seront changées la veille de la Procédure Expérimentale (environnement familier + cage propre). Les animaux recevront un carré en coton (ou cellulose) propre pour leur permettre de former un nid et de la nourriture humidifiée en période de convalescence.

16360 Le cancer est une maladie complexe, qui résulte de la prolifération non contrôlée de certaines cellules. Les traitements historiques tels que les agents de chimiothérapies agissent en bloquant la prolifération des cellules. Un des écueils rencontré par l'emploi de ces traitements est leur manque de spécificité vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ils bloquent également la prolifération des cellules saines de l'organisme. Cette action est responsable des effets secondaires sévères de la chimiothérapie. Effets qui compromettent l'efficacité des traitements anti-cancéreux. Une autre génération de traitements s'attaque aux anomalies présentes dans les cellules cancéreuses. On parle alors de traitements ciblés.

Ces traitements ont moins d'effets secondaires et ils sont en plein essor. Pour développer ces traitements il est nécessaire d'identifier des cibles –anomalies spécifiques des cellules cancéreuses– et de montrer que leur ciblage a un effet anti-tumoral. Le but de ce projet est de valider une nouvelle cible des cellules cancéreuses. Des cellules cancéreuses exprimant la cible sont modifiées génétiquement au laboratoire pour ne plus exprimer la cible d'intérêt. Ces cellules seront greffées à des souris immunodéprimées. La cinétique de croissance des tumeurs issues des cellules parentales (contrôles) et des cellules n'exprimant plus la cible (modifiées) sera mesurée. La comparaison des cinétiques permettra de valider la cible et d'établir qu'elle constitue une vulnérabilité des cellules cancéreuses.

La réalisation du projet respectera la règle des 3R.

Remplacement : des tests *in vitro* réalisés au laboratoire ont montré la dépendance des cellules étudiées pour STARD3 et ont remplacé l'utilisation d'animaux. En effet, cette étude nécessite à présent l'utilisation d'animaux afin de confirmer les résultats déjà obtenus *in vitro*.

Réduction : l'examen de la littérature permet de réduire le nombre de conditions expérimentales et en conséquence le nombre d'animaux. Notre projet a pour but de comparer la croissance tumorale consécutive à l'implantation de cellules cancéreuses humaines contrôles et n'exprimant plus STARD3. Nous travaillerons sur des groupes expérimentaux de 10 souris pour chaque lignée cellulaire étudiée. Une cohorte est constituée de 30 animaux soit trois groupes de 10 souris. Le groupe A sera dédié à la lignée cellulaire d'origine mammaire HCC1954, le groupe B à la lignée cellulaire d'origine gastrique NCI-N87 et le groupe C à la lignée cellulaire d'origine mammaire MDA-MB-231 ne dépendant pas de STARD3. La taille des cohortes est définie par rapport aux données de la littérature. L'utilisation de deux sites d'injection sur le même animal (cellules STARD3 WT et STARD3 KO injectées respectivement sur le flanc droit et gauche de la même souris) permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. L'expérience sera reproduite quatre fois en utilisant des préparations cellulaires indépendantes afin d'avoir une optimisation des analyses statistiques. Le nombre total d'animaux est de 120.

Raffinement : la présence et la taille des tumeurs seront mesurées par une méthode d'imagerie sensible qui détecte des tumeurs à un stade infra clinique et permet une quantification précise des tumeurs de petite taille. Comparée aux techniques standards, l'utilisation de cette méthode préservera au mieux le bien-être de l'animal jusqu'au terme de l'expérience. Les procédures douloureuses sont réalisées sous anesthésie en prévenant le refroidissement des animaux. Nous n'attendons pas de signes cliniques péjoratifs liés à cette procédure jusqu'à son terme soit 5 semaines. Cependant si le point limite 1 est atteint (la taille de la tumeur est supérieure à 10 mm sur sa plus grande longueur), il y aura arrêt de l'expérience pour cet animal, euthanasie et prélèvements des tumeurs pour analyses. Si l'un des points limites non lié à la taille tumorale (Point limite 2 : ulcération ou la nécrose de la peau au niveau de la tumeur sous-cutanée ; Point limite 3 : une dégradation de l'état général de l'animal visible par une perte de poids dépassant 20 % du poids normal, perte d'activité, une posture anormale ou autre expression de la souffrance) est atteint le personnel de l'animalerie sera averti afin de vérifier l'état sanitaire des animaux et de mettre en place une procédure adaptée. De plus, le poids des animaux sera suivi chaque semaine afin d'identifier une éventuelle souffrance.

16361 Les pathologies vasculaires (thromboses, sténoses, accidents vasculaires cérébraux, infarctus...) représentent un enjeu majeur pour la santé et constituent une préoccupation croissante avec l'augmentation des populations à risque (vieillesse de la population, modes de vie...).

L'implantation de dispositifs médicaux vasculaires sont des approches thérapeutiques indispensables pour soigner ces maladies. Avec le développement de nouvelles technologies, les limites des actes chirurgicaux sont sans cesse repoussées avec le souci permanent de réduire le traumatisme chirurgical et les complications, de raccourcir les temps opératoires et les phases de récupération. Ces nouvelles technologies permettent également au chirurgien de réaliser des actes impossibles auparavant. La chirurgie mini-invasive, la chirurgie assistée par robotique, la chirurgie transluminale, la chirurgie endovasculaire, la chirurgie vasculaire sous coelioscopie ... sont autant d'exemples qui illustrent ces avancées et la transformation de la pratique chirurgicale.

Le projet de recherche a pour objectif d'évaluer et de développer de nouveaux dispositifs et techniques pour les affections vasculaires au niveau des coronaires, des vaisseaux périphériques et des vaisseaux cérébraux. Les limites actuelles des pratiques chirurgicales sont leur invasivité ou la durabilité des dispositifs et des matériaux utilisés qui peuvent être « rejetés » par l'organisme. Les bénéfices attendus par le développement de ces nouveaux dispositifs sont l'amélioration de la durabilité des implants (éviter le rejet et ainsi les ré-opérations parfois multiples des patients), la réduction du traumatisme tissulaire et l'abord chirurgical le moins invasif possible.

Le projet prévoit le recours à des modèles de grandes tailles, justifiés par une taille et une fonction tissulaire proche de ceux de l'Homme, avec un maximum respectivement de 200 porcins, 50 canins, 200 ovins et 50 canins. Le nombre a été évalué et réduit au minimum nécessaire pour répondre aux besoins et objectifs scientifiques des études.

Les modèles animaux suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences et techniques médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, plateau technique opératoire et d'imagerie de pointe). Afin de réduire au maximum le nombre de modèles, des méthodes d'imagerie non douloureuses permettront de sélectionner au mieux les modèles avant leur entrée en procédure (screening, IRM, scanner / reconstruction 3D. Les procédures expérimentales sont classées modérées, sévères et sans réveil. Tous les actes de chirurgies et les mesures de prise en charge complète de la douleur ont été validées par une équipe de vétérinaires afin de garantir le bien-être animal.

16362 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, la densité en 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.

L'implication de la plasticité neuronale dans des pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives (troubles du spectre autistique, maladie d'Alzheimer par exemple) est de plus en plus rapportée. 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 340 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.

16363 Les troubles du mouvement sont des maladies 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, pouvant notamment entraîner des mouvements répétitifs ou des postures figées. 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 maladies 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 maladies: le phénol ou la toxine botulique. Cette approche présente de clairs avantages devant celles présentées précédemment, notamment concernant les effets secondaires. Toutefois, cette approche doit 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 les effets bénéfiques de l'utilisation locale de différents produits myorelaxants novateurs à effet rapide et durable, sur la contraction musculaire pour les patients souffrant de troubles du mouvement comme la dystonie et la spasticité. Au cours d'une étude princeps, nos travaux préliminaires nous ont permis d'identifier au moins 5 produits présentant une activité myorelaxante d'intérêt. Chacun des produits semble avoir des caractéristiques pharmacologiques différentes : certains induisent une myorelaxation très rapide, et d'autres offrent un effet durable par exemple. Or, selon la maladie neuromusculaire, le besoin clinique est différent, et donc chaque caractéristique est plus ou moins critique. Nous visons ainsi le développement de plusieurs produits, car nous envisageons la possibilité de positionner chacun des produits finaux pour le traitement de différentes maladies neuromusculaires.

A terme, nous démontrerons les bénéfices de nos produits face aux produits de référence utilisés en clinique. Ce projet expérimental d'optimisation concerne le second produit d'intérêt identifié suite à nos travaux exploratoires.

Il n'existe à ce jour pas de test *in vitro* qui permette de tester la pharmacodynamique 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 le rongeur. Nous avons au cours d'une étude précédente obtenu des résultats prometteurs, et identifié un produit candidat avec une activité myorelaxante rapide et durable. 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.

Cette étude a pour objectif : D'optimiser les paramètres d'utilisation du candidat (en particulier la formulation et les doses). Dans cette étude, le produit sera injecté localement aux rats, dans les

membres postérieurs pour un suivi du « digit abduction score » (DAS). Cette procédure (injection et test DAS) est brève, indolore, et peu stressante pour les animaux. Notre produit sera comparé au traitement actuel de référence.

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 donné un certain recul sur la taille des groupes nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs ; nous souhaitons toutefois encore optimiser ce paramètre au cours de cette étude pour diminuer le nombre total d'animaux permettant d'arriver à une conclusion.

Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe de 2 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. Au cours de cette étude, nous souhaitons continuer à limiter au maximum le stress des animaux.

En conclusion, cette étude nous permettra donc de quantifier de manière robuste la valeur ajoutée de notre produit en utilisant 390 rats (souche : Sprague-Dawley femelles). Ces données serviront de base à la conception d'essai clinique chez l'homme.

16364 Les cellules souches pluripotentes induites humaines ou hiPSCs (human induced Pluripotent Stem Cells) peuvent être générées *in vitro* par reprogrammation, à partir d'une cellule somatique. Ces iPSCs sont équivalentes aux cellules souches pluripotentes de type embryonnaire (hESC). Elles ont une capacité d'autorenouvellement illimité et ont la caractéristique unique de pouvoir se redifférencier dans les trois feuilletts embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) pour redonner l'ensemble des cellules d'un organisme. Une cellule pluripotente n'est pas totipotente. Il n'est pas possible de créer un organisme à partir de celle-ci, *in vivo* ou *in vitro*.

Ces lignées cellulaires une fois différenciées représentent un outil précieux pour le traitement de nombreuses maladies soit en envisageant son utilisation en médecine régénérative par thérapie cellulaire pour régénérer un tissu endommagé, par la maladie, l'accident ou le vieillissement, ou encore pour modéliser des pathologies et cribler pour de nouveaux médicaments. Avoir une technique fiable pour qualifier la pluripotence des cellules iPSCs reste une question centrale.

Il existe donc un besoin pour des essais permettant de démontrer qu'une lignée cellulaire humaine donnée est pluripotente. Un groupe d'experts internationaux dans le domaine des cellules souches ont défini des critères qualitatifs permettant de définir ce qu'est une iPSCs et quels sont les critères à utiliser pour caractériser et valider la pluripotence. Dans ce cadre nous analyserons l'expression membranaire de marqueurs de surface tel que SSEA-3, SSEA-4 et TRA-1-60, la stabilité génomique et afin de valider définitivement la pluripotence de ces lignées, nous effectuerons un test de formation de tumeurs bénignes ou tératomes par une injection d'iPSCs dans des souris immunodéficientes.

Il existe donc un besoin pour des essais permettant de démontrer qu'une lignée cellulaire humaine donnée est pluripotente. Ainsi, l'injection de cellules souches pluripotentes induites humaines dans une souris immunodéprimée induit l'apparition d'un tératome uniquement si les cellules de départ possèdent cette caractéristique de la pluripotence, c'est-à-dire étant capable de redonner potentiellement un organisme. Les tératomes sont des tumeurs constituées d'un assemblage de tissus histologiques différenciés, adultes ou embryonnaires. Ces tissus ne sont pas organisés comme dans un embryon normal, mais sont, séparément, parfaitement normaux. Dans la tumeur, peuvent ainsi cohabiter des éléments de peau, des dents, du tissu nerveux, des ébauches hépatiques, etc. Les expériences de formation de tératomes *in vivo* couplées à une analyse anatomo-histopathologique sont considérées à l'heure actuelle comme le test de pluripotence le plus pertinent. En effet, ils permettent une confirmation fiable, plus complète qu'un test *in vitro*.

Dans ce cadre, des dispositions sont prises pour l'application de la règle des 3R :

« Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end- points") : nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux avec un suivi quasi quotidien des animaux. Après l'injection des cellules humaines un suivi tous les deux jours pour suivre l'augmentation de taille du tératome et le comportement des animaux injectées. Ainsi une observation quotidienne permettra selon la vitesse de croissance des tumeurs d'arrêter l'expérience le plus tôt possible. De plus après les injections une attention particulière aux comportements lié à l'angoisse et la souffrance des animaux sera suivie par les animaliers lors du changement des litières et quotidiennement par une personne habilitée de notre équipe pour le suivi du stress en plus d'une surveillance quotidienne globale de l'état de santé. Une maison en carton sera ajoutée à ces cages pour que les souris puissent se cacher.

« Remplacer » les modèles animaux : nous avons choisi la souris par la diversité des tissus qui apparaissent. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant en une seule expérience et totalement cette procédure expérimentale. Dans le cadre de ce projet l'utilisation de 94 animaux (4 souris dont deux mâles et deux femelles pour la mise au point et $45 \times 2 = 90$ souris dont moitié seront des mâles et l'autre moitié des femelles) est prévue sur une période de 5 ans, ceci afin de caractériser la pluripotence de 45 clones d'iPSCs produits sur cette période.

« Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation. Nous avons prévu le nombre minimal nécessaire d'animaux pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats et tester chez un mâle et une femelle la production de tératome. Si nous constatons qu'il n'est nécessaire d'utiliser qu'une seule souris nous ajusterons le nombre de souris utilisées en le divisant par deux.

16365 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. L'objectif de ce projet est de premièrement évaluer le rôle de l'IL-34 (Interleukine-34) dans le développement de l'encéphalomyélite immunitaire expérimentale (EAE) induite par la glycoprotéine MBP (myelin basic protein) chez le rat Sprague Dawley. Et dans un second temps, évaluer le potentiel thérapeutique d'une surexpression de l'IL-34 dans ce modèle d'EAE.

Des études menées par notre équipe ont mis en évidence que l'IL-34 est une cytokine exprimée par les T régulatrices CD4+ et CD8+ et permet d'induire une tolérance à l'allogreffe. De plus, cette cytokine régulatrice est aussi nécessaire au recrutement et développement de la microglie: le système immunitaire du système nerveux central. L'hypothèse suggérée est que l'IL-34 agit en recrutant/augmentant la microglie et/ou en favorisant l'expansion et les fonctions régulatrices des Tregs offrant une protection en diminuant l'inflammation. Son absence induirait un développement de la maladie plus précoce et au contraire sa surexpression serait protectrice.

Le nombre total d'animaux sera de 40.

Dans cette saisine, la règle des 3R a été 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 plaques.

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit au nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats 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 d'animaux nécessaire aux deux objectifs sera de $2 \times 20 = 40$.

-Raffiner : Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de l'EAE. Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant une paralysie sévère.

Tous les animaux seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans la moelle épinière, et par immuno-histologie pour étudier l'infiltration des cellules dans les tissus inflammés.

16366 Un dispositif médical implantable (DMI) est conçu pour être implanté en totalité ou en partie dans le corps humain ou placé dans un orifice naturel. Il s'agit par exemple des prothèses articulaires, des implants dentaires, des stents, du matériel d'ostéosynthèse...

Notre projet vise à évaluer plus particulièrement des DMI, résorbables ou non résorbables, destinés à une utilisation dans les voies urinaires ou génitales: bandelettes sous-urétrales, implants pelviens, stents urétral, sphinters artificiels, etc...

La mise sur le marché de ces dispositifs demande une évaluation complète permettant de garantir leur innocuité pour le patient sur le long terme, ainsi que leur efficacité. Pour cela de très nombreux tests sont réalisés *in vitro*: génotoxicité, cytotoxicité, hémolyse: ces tests primaires permettent d'écartier tout dispositif ne présentant pas les qualités minimales requises, et d'obtenir des informations importantes sur la tolérance et la dégradation des dispositifs.

D'autres tests pré-cliniques doivent obligatoirement être réalisés chez l'animal, notamment en ce qui concerne la tolérance locale, et les performances en conditions normales d'utilisation.

Ces évaluations, lorsqu'elles s'inscrivent dans un contexte réglementaire, sont encadrées par la norme ISO 10993.

Pour notre projet, les essais auront lieu chez le Rat ou le Lapin, espèces préconisées par la norme 10993, ou chez le Porc pour certains dispositifs de plus grande taille (évaluation en conditions d'utilisation).

Au maximum 200 rats, 100 lapins et 100 Porcs seront utilisés sur 5 ans, pour l'évaluation de différents dispositifs. Ces effectifs sont le minimum nécessaire pour évaluer plusieurs dispositifs sur 5 ans, en obtenant des résultats fiables. Le nombre d'animaux utilisés pourra être inférieur si moins de dispositifs sont évalués ou si des méthodes innovantes permettent de les remplacer par des tests *in vitro* ou *in silico*. Le nombre d'animaux total prévu est d'ores et déjà réduit grâce à l'utilisation de techniques d'imagerie (fluorescence, scanner, IRM, échographie).

La prise en charge des animaux suivra les bonnes pratiques vétérinaires en usage, afin de leur éviter tout dommage ou douleur: les chirurgies seront réalisées par des praticiens expérimentés, sous anesthésie générale et avec une prise en charge de la douleur adaptée (anti-inflammatoires, opiacés)

Afin de limiter le stress des animaux, leurs conditions de vie répondront aux besoins de chaque espèce, en ce qui concerne les contacts sociaux, l'environnement (conditions d'ambiance, enrichissement) et l'alimentation.

Ces évaluations permettront la mise au point de dispositifs médicaux innovants, dans l'objectif d'améliorer la qualité de vie des patients et d'alléger la prise en charge de certaines pathologies telles que, entre autres: l'incontinence urinaire, la sténose urétrale, les descentes d'organes... (réduction des récidives et des ré-interventions chirurgicales par exemple)

16367 Le microbiote intestinal est composé de 1014 bactéries, essentielles dans la santé de l'individu. Toute altération de cette communauté impacte différents organes (intestin, foie, tissu adipeux, cerveau) induisant de nombreuses maladies notamment métaboliques. Nous posons l'hypothèse que le microbiote participe à la relation activité physique et bien être. Le but de ce travail est de déterminer l'effet de l'activité volontaire sur la composition et la fonction du microbiote intestinal et d'en analyser les conséquences sur le stress biologique des animaux. Nous testerons chez la souris adulte, l'entraînement en roue d'activité spontanée pendant 8 semaines (Groupe Roue) par rapport à des conditions d'élevage classique en cage considéré comme un modèle de sédentarité (Groupe Sed).

Les résultats seront à transposer chez les espèces d'intérêt agronomique de plus grande taille (notamment : lapin, ovin). Dans le cadre des principes de l'agroécologie et du respect du bien-être, l'identification de ce lien constituerait une première étape scientifique pour la compréhension et la

réflexion/conception de nouveaux modes d'élevages en rupture avec des élevages conventionnels (animaux élevés en cage i.e. inactifs vs ceux élevés en extérieur).

Pour cette étude nous prévoyons d'utiliser 24 souris.

Le suivi des animaux sera réalisé selon les règles en vigueur de la directive 2010/63 (surveillance quotidienne, soin 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

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'abandon de certaines souris dans l'expérimentation.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") :

Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos 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... Nous n'attendons aucune souffrance chez nos animaux. Le report semainier des poids corporels sera un paramètre intégré à nos protocoles. 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 et euthanasié si les signes persistent dans les 24h.

- « Remplacer » les modèles animaux :

L'étude du rôle de l'activité physique sur le bien-être en lien avec le microbiote intestinal ne peut être réalisée sur des modèles cellulaires déconnectés des systèmes de communication (système nerveux, système endocrinien, flore intestinale). Ce projet inclut des procédures sur des modèles murins car il est important ici de préserver le dialogue entre les organes (muscle, tissu adipeux, foie, cerveau, intestin, glandes surrénales), contexte qu'il n'est pas possible de recréer sans étude *in vivo*. Des variables sur l'organisme entier seront ainsi mesurées (poids corporel, recueil de fèces, glycémie, composition corporelle...).

16368 Les troubles de consommation d'alcool sont un problème de santé publique dans le monde. En 2016, plus de 2 millions de décès étaient liés à des maladies causées par une consommation chronique d'alcool. Dans l'Union Européenne, 11 millions de personnes âgées de 18 à 64 ans sont touchés par des troubles de consommation à l'alcool. Malgré cet impact socio-économique dévastateur il n'existe toujours pas de traitements efficaces.

Des différences entre les hommes et les femmes ont été identifiées dans les troubles de consommations d'alcool et le cycle hormonal est suggéré comme un facteur important de ces différences. La progestérone, une hormone stéroïdienne, réduit les comportements addictifs, suggérant un potentiel thérapeutique de cette hormone dans le traitement de l'addiction aux drogues. Cependant, l'effet de la progestérone dans les troubles de consommation d'alcool reste inconnu.

Enfin, la maltraitance infantile est l'un des facteurs environnementaux principal prédisant l'addiction à l'alcool, cependant le substrat biologique reliant ces maltraitances infantiles avec le développement de l'addiction à l'alcool reste inconnu.

Une région du cerveau appelée le cortex insulaire, ou insula, est connue pour jouer un rôle important dans la dépendance à l'alcool et exprime les récepteurs à la progestérone. De plus, le cortex insulaire a été montré comme hyperactif chez des patients anxieux. Ainsi, l'insula pourrait être une région clé dans le dimorphisme sexuel de l'addiction à l'alcool et dans l'effet du stress post natal dans le développement de cette même pathologie.

Ce projet a pour but de mettre en évidence des altérations du fonctionnement de circuits neuronaux impliquées dans l'addiction à l'alcool dans un modèle de prise excessive d'alcool chez la souris, afin de pouvoir envisager des stratégies de restauration de ces altérations chez les patients souffrant de troubles de consommation d'alcool.

Remplacer : Le projet porte sur une analyse de la connexion des neurones et de leurs propriétés de transmission d'informations au cours du comportement. Par conséquent cette procédure doit être effectuée chez des animaux vivants. Des méthodes telles que la culture cellulaire ne permette pas la quantification des connexions neuronales ou la mesure de l'activité en réponse à une stimulation sensorielle *in vivo*.

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux afin d'obtenir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques) et complète de la connectivité et de l'activité de la région cérébrale d'étude. Nous utiliserons ainsi 4800 animaux sur cinq ans.

Raffiner : Les animaux seront hébergés en cages collectives, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les cages seront également enrichies en nids en coton. Une surveillance particulière sera adressée aux animaux en période péri-opératoire. L'acte chirurgical sera effectué dans des conditions de propreté maximales. Des antibiotiques et analgésiques seront administrés en cas d'infection ou de douleur.

16369 L'évaluation et le développement de nouvelles méthodes, molécules, dispositifs et techniques pour les affections de l'appareil digestif et ses annexes par des méthodes de chirurgie et mini-invasives nécessite une phase de recherche pré-clinique et développement qui permet de mettre au point ces méthodes et vérifier leur sécurité. Les maladies digestives sont un enjeu majeur de santé publique. Cancers, pathologies liées à l'alcool ou aux virus de l'hépatite B et C, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (dont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique), urgences digestives, reflux gastro-oesophagien, troubles fonctionnels intestinaux, affections proctologiques, chirurgie de l'obésité. On recense plus de 800 maladies digestives. De nombreux facteurs de risque influencent ces maladies : les agents infectieux, les modes de vie (précarité, alcool, tabac, toxicomanie, sexualité, alimentation, surpoids et stress) et l'âge. Le tube digestif peut être également particulièrement touché dans d'autres maladies comme l'obésité par exemple. Bien souvent associées à une diminution de l'espérance de vie et/ou une altération majeure de la qualité de vie des malades et de leurs proches, les maladies digestives ont un coût humain et sociétal élevé. Aujourd'hui près de 2 français sur 10 en souffrent. La fréquence de ces maladies devrait encore augmenter dans les années à venir en raison notamment du vieillissement de la population. Ces 20 dernières années, la prise en charge des maladies digestives a bénéficié d'importants progrès diagnostiques, thérapeutiques ainsi que technologiques avec le développement principalement de nouveaux dispositifs médicaux et molécules qui ont ouvert la voie à l'endoscopie, la coelochirurgie et de la chirurgie mini-invasive ... Ce projet s'intéresse à l'ensemble des techniques pour le traitement des pathologies de l'appareil digestif et de ses annexes c'est-à-dire le tube digestif lui-même : bouche, œsophage, estomac, intestin grêle (petit intestin), côlon (gros intestin), rectum et anus ; et ses glandes associées : pancréas, foie et voies biliaires ... L'évaluation de nouvelles méthodes pour la réparation du tissu en gastro-entérologie s'intéressent au diagnostic, la réparation / remplacement / palliation de différents segments de l'appareil digestif et ses annexes. La limite des techniques actuelles réside par exemple dans leur invasivité, la nécessité de recours à des techniques palliatives avec grands inconfort (poche de colostomie ...), ainsi que la durabilité des dispositifs / matériaux utilisés qui peuvent être « rejetés » par l'organisme (reconstruction entérale et infections). L'avantage escompté est une amélioration de la durabilité des implants (éviter le rejet et ainsi les ré-opérations parfois multiples des patients) et réduire le traumatisme tissulaire, de diagnostiquer et pallier à une dysfonction d'un ou plusieurs segments de l'appareil digestif. Les modèles animaux utilisés dans ce projet suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, et plateau technique de bloc opératoire et d'imagerie de pointe). La chronologie médicale inclura l'implantation et le suivi par imagerie de type échographique, angiographique, endoscopie et scanner par exemple et de suivi clinique et examens complémentaires permettra d'assurer un cadre d'évaluation scientifique optimal mais aussi un suivi rapproché de l'évaluation de l'état de santé générale et du bien-être des animaux implantés. Des modèles animaux de grande taille seront utilisés, avec environ 60 implantations par an sur une durée de 5 ans, sur des porcins (n. 200), ovins (n. 50), et canin (n. 50). Cela permettra sur 5 ans de valider les différents prototypes et réaliser les tests réglementaires de sécurité requis par les autorités. Il est donc indispensable d'avoir recours à

la modélisation au préalable afin de vérifier le bon fonctionnement et la sécurité. Cela doit impérativement se faire sur des organes de taille identique aux organes de l'homme dans des conditions qui reproduisent la réalité de l'organe et de vérifier les effets secondaires néfastes sur l'ensemble de l'organisme. Les tests sur l'organisme entier sont donc incontournables. Cette phase de recherche pré-clinique est le filtre indispensable pour assurer la sécurité des futurs patients. Afin de réduire au maximum le nombre de modèles, des méthodes d'imagerie non douloureuses permettront de sélectionner au mieux les modèles avant leur entrée en procédure (screening échographique, angiographique, IRM, scanner / reconstruction 3D afin de simuler numériquement l'adéquation du prototype à l'anatomie (logiciel 3D). L'ensemble des tests sera réalisé sous anesthésie générale, et 3 modes d'analgésie (locale et générales (morphiniques + AINS) permettront de traiter la douleur. Ce projet permettra donc de développer des nouvelles techniques peu invasives et de nouveaux matériaux et procédés dans le cadre des affections du tractus digestif.

16370 Parmi les tissus des organismes vertébrés, le muscle squelettique est l'un des plus remarquable puisqu'il possède de grandes capacités régénératrices grâce à des cellules souches musculaires. En revanche, les maladies musculaires, comme les dystrophies, qui se caractérisent par différents degrés de sévérité pouvant être handicapantes et même mortelles, restent jusqu'à maintenant incurables. La thérapie cellulaire, étant un moyen de traitement des dystrophies, restent toujours inefficaces. La faible efficacité est normalement due à la pauvre capacité de la transplantation des cellules greffées dans les muscles. Dans ce cadre-là, nous avons établi un nouveau protocole de différenciation des cellules souches embryonnaires murines (mESC) et des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) vers la lignée myogénique. Ce protocole permet de produire des cellules qui sont à l'origine des cellules musculaires et qui ont des propriétés *in vitro* similaires à celles des cellules souches. En outre, ces cellules peuvent être produites en grandes quantités favorisant la modélisation et le développement des thérapies cellulaires pour guérir les patients souffrant d'une maladie musculaire. Afin de tester la fonctionnalité de ces cellules *in vivo* dans le contexte de la régénération musculaire, nous réaliserons des lésions musculaires suivi par des greffes de cellules musculaires produites à partir des mESC et des hiPSC dans un modèle de souris souffrant de dystrophie de Duchenne, une maladie génétique incurable qui touche les garçons dont l'espérance de vie ne dépasse pas l'âge de 30 ans. Ces expériences nous permettront d'analyser la capacité des cellules musculaires produites à régénérer un muscle lésé, comme dans ce type de maladie. Le plan d'expérimentation animale mis en place suit strictement le principe des 3R: Pour remplacer, nous faisons tous les tests d'optimisation du protocole *in vitro* et juste après nous ferons les greffes. Pour réduire, nous utiliserons le minimum d'animaux nécessaires pour avoir une étude conclusive. Pour le raffinement, la souffrance et le stress induit aux animaux seront minimisés au maximum par des analgésiques administrés avant et après les procédures. Notre étude nécessitera un total de 90 souris repartis sur 2 procédures expérimentales, dont seulement 54 seront soumis aux lésions et greffes musculaires.

16371 Les sensations de douleur sont des symptômes communs dans la maladie de Parkinson, négativement associées avec la qualité de vie des patients, et ayant un impact plus fort que les symptômes moteurs. Ces symptômes restent cependant peu pris en compte cliniquement et leurs mécanismes sous-jacents sont peu étudiés et compris.

Les symptômes douloureux peuvent être présents chez environ 85 % des patients parkinsoniens. Différents types de symptômes de douleurs peuvent être distingués avec des douleurs :

- causées par des affections des os, articulations, muscles, tendons ou ligaments (musculosquelettiques, ~ 58.5%),
- déclenchées par une hyperpression sur une racine nerveuse, à l'intérieur ou à proximité de la colonne vertébrale (neuropathiques radiculaires, ~ 38 %),
- dues à une atteinte à n'importe quel niveau du système nerveux central (neuropathiques centrales ~ 8.5 - 27 %),
- induites par les mouvements anormaux tels que les dystonies (contractions involontaires des muscles) ou dyskinesies (mouvements anormaux involontaires) (~ 33.5 %).

Le seuil de douleur est également altéré chez les patients Parkinsoniens, présentant ou non des symptômes de douleur, la littérature reste cependant contradictoire concernant cette altération.

Ces symptômes de douleurs sont donc un souci majeur dans la prise en charge de la maladie.

Les douleurs neuropathiques centrales sont décrites par les patients comme des sensations douloureuses bizarres et sans cause apparente telles que des douleurs vives, des sensations de brûlures, des fourmillements ou irritations douloureuses. Ces symptômes prédominent du côté du corps le plus affecté par la maladie et ne sont pas reliés aux autres symptômes douloureux décrits précédemment. Les douleurs centrales et altérations des seuils de douleur dans la maladie de Parkinson, sur lesquelles portent ce projet, suggèrent que les circuits cérébraux permettant de percevoir et traiter les informations douloureuses pourraient être dysfonctionnels dans la maladie de Parkinson mais ces réseaux n'ont jamais été étudiés dans ce contexte. Ce projet a ainsi pour but d'approfondir nos connaissances sur l'état fonctionnel de ces réseaux dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson.

Le projet est composé de 3 procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 84 rats au total 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 suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement : Le projet implique la mise en place d'un état pathologique chez le rongeur avec de la chirurgie lésionnelle 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 les signes de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée.

Remplacement : Ce projet a pour but de mesurer l'état fonctionnel d'un réseau de structures, en particulier leurs réponses sensorielles par des stimulations naturelles. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation *in vivo* par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle.

16372 En transplantation d'organes, deux types de rejets peuvent survenir, aiguë ou chronique, les deux impliquant l'action des cellules du système immunitaire. Il est maintenant reconnu que la réponse humorale (production d'anticorps anti-donneur) est le principal déterminant du devenir des greffes. Lors de cette réponse, les anticorps sont produits par les lymphocytes B du patient greffé et vont détruire les greffons. A ce jour, les traitements classiques contrôlent encore très mal ce mécanisme de rejet. Des résultats prometteurs ont été obtenus *in vitro* dans notre laboratoire avec l'utilisation d'un nouvel immunosuppresseur montrant qu'il pouvait bloquer la production d'anticorps.

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, nous devons être en mesure d'étudier chez l'animal comment se comportent les cellules immunitaires humaines. Seule la souris immunodéficiente permet l'étude des cellules humaines *in situ* à l'échelle d'un organisme entier.

L'objectif principal de cette étude préliminaire est de comparer deux techniques d'injections de cellules sanguines humaines (dans les veines ou directement dans la rate) dans des souris immunodéficientes et d'analyser les cellules immunitaires B et T.

Un article publié en 2008 par une autre équipe a montré l'avantage d'injecter les cellules humaines directement dans la rate (en intra-splénique) comparé à l'injection classique par voie intra-veineuse. Dans cette étude, l'injection intra-splénique favorisait la survie et la fonction des lymphocytes B. Nous souhaitons donc, avant de nous lancer dans un projet plus vaste, vérifier que ce mode d'injection est supérieur en comparaison avec une injection intra-veineuse. Cette expérience préliminaire nous orientera donc sur la mise en place du modèle définitif d'étude et la nécessité ou non d'utiliser un acte chirurgical (injection intra-splénique).

Des mesures de raffinement seront mises en place pour limiter au maximum le stress des animaux et contribuer à leur bien-être et réduire leur douleur. Lors des injections intra-veineuses et des prélèvements sanguins, les animaux seront sous anesthésie gazeuse isofluorane. Lors des injections intra-spléniques, les animaux recevront une dose d'anesthésiant par voie intra-péritonéale avant

l'anesthésie gazeuse. Nous aurons recours à une surveillance quotidienne tout au long de l'expérience et à une euthanasie en cas de perte de poids trop importante.

Pour ce projet nous envisageons d'utiliser un maximum de 48 souris sur 6 mois.

16373 Ce projet a pour but de mettre à la disposition de la communauté scientifique ou de l'industrie pharmaceutique des produits biologiques prélevés sur rongeurs (sang, organes, urine, ...) qui sont hébergés dans un environnement enrichi.

Les produits biologiques d'origine animale (PBOA) sont utilisés par la communauté scientifique comme outils d'études, de diagnostics ou réactifs pour tests biologiques.

Ce projet respecte la règle des 3 Rs :

Remplacer : Le sang, des organes tout autre fluide ou élément de rongeurs (ex : liquide céphalorachidien, lait), sont des produits non substituables par des composés chimiques pour la réalisation de méthodes *in vitro*

Ces animaux sont prélevés en fonction des besoins des scientifiques dans le respect des recommandations éthiques.

Raffiner : Dans le cadre de ce projet, pour des raisons éthiques et/ou scientifiques, les prélèvements sont réalisés sur animaux sous anesthésie générale, avec ou sans réveil en fonction du prélèvement effectué ou sur animaux vigiles pour des prélèvements peu invasifs.

Réduire : Les prélèvements sont prioritairement réalisés sur des animaux surnuméraires.

Le nombre d'animaux est estimé à 500 souris, 155 rats et 80 cobayes par an, soit un total de 2500 souris, 775 rats et 400 cobayes sur la durée totale du projet.

Ce nombre d'animaux est directement lié aux demandes des scientifiques.

16374 Les maladies inflammatoires métaboliques comme le diabète de type-2 et l'obésité sont généralement associées à des changements au niveau de l'équilibre énergétique de l'organisme. Ces changements se traduisent 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 conduire ainsi 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 et des complications vasculaires et hépatiques qui y sont associées. Lors de nos études préliminaires, nous avons identifié un gène jouant un rôle dans la régulation de l'inflammation, et plus particulièrement dans la résolution de celle-ci. 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 le rôle de ces gènes dans le déséquilibre du métabolisme lipidique 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 ce gène dans les macrophages (cellules de l'immunité innée) sous un régime riche en graisse et nous allons évaluer leur santé métabolique en mettant en évidence leur capacité à assimiler les lipides grâce à un test métabolique spécifique (OLTT : oral lipid tolerance test). Les tests métaboliques évaluent la capacité de l'organisme à assimiler les sources d'énergie et sont communément utilisés pour évaluer l'état de santé.

Au total 40 animaux seront nécessaires. La recherche animale est indispensable pour ces études qui ne peuvent se faire en *in vitro*. Cela nous aidera à mieux comprendre les acteurs et les mécanismes pathologiques et thérapeutiques des problèmes de cicatrisation dans le diabète. La stratégie des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera donc respectée. En effet, le nombre d'animaux utilisé confère une puissance statistique satisfaisant. Une attention toute particulière sera portée afin d'éviter aux animaux de souffrir. Les animaux seront acclimatés à l'animalerie et seront habitués à être manipulés avec un suivi de poids hebdomadaire (pendant la durée du régime), en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux. Un enrichissement sera également disposé dans les cages ("maisons" en cartons) afin d'éviter au maximum que les souris ne blessent entre elles.

16375 Le projet : Augmenter la dépense énergétique est une façon de lutter contre l'obésité, devenue un fléau mondial et associée à de nombreuses comorbidités. Une façon d'augmenter cette dépense est d'activer la thermogenèse du tissu adipeux, ce qui a pour conséquence de brûler les graisses au lieu de les stocker.

Une nouvelle voie de contrôle de la thermogenèse a été identifiée et validée *in vitro* à l'aide de molécules synthétiques, y compris dans des modèles cellulaires humains.

Il est à présent indispensable de tester la modulation de cette voie *in vivo*, à savoir sur animal entier, afin de confirmer son efficacité sur le métabolisme énergétique associée à la perte de masse grasse. Pour ce faire, ces molécules seront injectées à des souris afin de tester si elles sont capables d'augmenter leur dépense énergétique et donc de leur faire perdre du poids. L'utilisation parallèle d'un modèle de souris mutée pour la cible est indispensable pour prouver la spécificité d'action des molécules synthétiques testées.

Les animaux :

* Type : Souris immunocompétente C57BL/6J et génétiquement altérée par mutation naturelle de RORalpha.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 504 souris expérimentales 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 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 nouvelles thérapies anti-obésité, pathologie prédisposant à de multiples comorbidités et 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 au modèle étudié.

16376 L'incidence des maladies rénales chroniques est en progression constante et représentent actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Ainsi en France les maladies rénales d'origine 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 est plus ou moins lente mais 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.

Ce projet vise à comprendre les mécanismes d'action de facteurs de croissance qui lient le récepteur à l'EGF, une voie qui joue un rôle clé dans l'aggravation de la maladie rénale. Nous étudierons plus particulièrement leur régulation, fonction et rôle dans l'évolution de la maladie.

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. Pour cela nous disposons de plusieurs modèles de pathologies rénales expérimentales bien établis chez la souris comme la réduction néphronique (ablation partielle du rein) ou la néphropathie médicamenteuse (injection de molécules néphrotoxiques). Ce sont des modèles qui entraînent une altération progressive du tissu rénal. Nous appliquerons ainsi ces 2 modèles de maladie rénale à des souris génétiquement modifiées.

Nous avons voulu aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'action du facteur de croissance EGF, après avoir constaté avec des études *in vitro* que la diminution son expression pourrait être liée à une diminution du stress osmotique. Afin de vérifier cette hypothèse *in vivo*, nous allons soumettre des souris à des modificateurs du stress osmotique comme le Lasilix (un diurétique) ou une charge hydrique. Ces tests sont couramment utilisés chez l'homme en clinique pour étudier le pouvoir de concentration des urines et aucune souffrance n'a jamais été décrite par les patients.

Ce projet sur 5 ans utilisera 510 souris. Toutefois 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 : les deux modèles de maladie rénale utilisés entraînent une altération progressive du tissu rénal. Comme chez l'homme, ces maladies restent longtemps silencieuses et les animaux seront mis à mort avant l'apparition de symptômes douloureux.

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. Dans le cas contraire une supplémentation antalgique sera introduite, et on choisira en dernier recours l'euthanasie de l'animal. Les animaux bénéficieront d'un programme d'enrichissement, comme des carrés de cellulose, 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.

16377 Les patients ayant subi un infarctus du cœur sont souvent sujets à une insuffisance cardiaque. Cette pathologie survient quand la perte de muscle est importante et se traduit par une incapacité du cœur à effectuer son rôle de pompe correctement.

Le potentiel de réparation du cœur adulte humain étant limité, les patients ont recours à une transplantation d'organe lorsque la maladie est trop grave. Toutefois, les limites de cette transplantation font explorer de nouvelles pistes thérapeutiques, dont la transplantation de cellules. On a longtemps pensé que les cellules injectées dans le cœur se transformaient en nouvelles cellules cardiaques. En réalité, elles semblent principalement agir en sécrétant des substances qui activeraient des mécanismes de cicatrisation du cœur lui-même. Ces substances sont regroupées dans de petites particules libérées par les cellules, appelées vésicules, qui pourraient être les médiateurs des effets bénéfiques des cellules greffées. Les vésicules ont des capacités régénératrices et nous avons démontré chez l'animal que l'injection de vésicules était capable de dupliquer les effets thérapeutiques de la transplantation de cellules.

Un facteur d'efficacité déjà identifié lors du développement de thérapies cellulaires est le temps de contact entre le produit thérapeutique et la zone à traiter. En effet, pour être pleinement efficaces, les vésicules doivent être présentes pendant une durée aussi prolongée que possible dans les zones traitées. Les biomatériaux sont donc potentiellement intéressants comme plateformes de délivrance des vésicules. Notre objectif est d'incorporer les vésicules dans un biomatériau sous la forme d'un hydrogel d'acide hyaluronique. Ce dernier permettrait leur libération contrôlée et des effets prolongés sans avoir à répéter les injections.

Le gel peut se présenter sous forme injectable (administration peu invasive et/ou facilitée) ou sous la forme d'un patch bio-imprimé (contrôle fin de la répartition des vésicules dans le gel pour une libération contrôlée).

L'objectif du projet est l'étude des effets thérapeutiques de l'administration de vésicules extracellulaires (VE) potentialisée par le biomatériau sur le muscle cardiaque après un infarctus. Ce projet se déroulera en 2 étapes principales :

1) La caractérisation *in vitro* de l'hydrogel contenant les vésicules.

Cela inclura l'évaluation de ses propriétés mécaniques pour une administration peu invasive (injectabilité) et sa persistance dans le myocarde. Le profil de libération des VE sera aussi établi pour montrer le potentiel de libération progressive à partir du gel. Le potentiel thérapeutique des vésicules sera étudié sur des modèles cellulaires. Cette étape *in vitro* nous permettra de remplacer ainsi l'utilisation d'animaux et d'optimiser le produit thérapeutique.

2) La comparaison du bénéfice thérapeutique de vésicules délivrées par l'hydrogel aux vésicules seules. A ce stade, le recours à l'animal est indispensable. Pour déterminer si la délivrance locale et prolongée des vésicules améliore leurs effets sur le myocarde infarci, l'hydrogel sera administré dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat. La maladie est déclenchée avec la création d'un infarctus du myocarde par chirurgie. Puis la fonction cardiaque est évaluée par échographie trois semaines plus tard. Dans un second temps, l'administration du traitement se fera par l'injection de l'hydrogel peu invasive dans le cœur (injection intramyocardique échoguidée) ou par une implantation du patch sur le cœur. Enfin l'efficacité du traitement est déterminée par évaluation de la fonction cardiaque (échographie) puis analyse histologique (étude du tissu à l'échelle microscopique) et transcriptomique (étude des gènes exprimés) du cœur 3 mois plus tard.

Ce projet se déroulant sur 5 ans nécessite 324 animaux au total. Une étude a été réalisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux sans compromettre l'analyse statistique des résultats. De plus, des études n'impliquant pas d'animaux (*in vitro*) vont être réalisées avant l'expérimentation animale pour choisir les meilleurs traitements à administrer aux animaux, ce qui permettra de réduire l'expérimentation animale. Il a été calculé qu'il faudrait de 37 animaux dans chacun des 6 groupes (49 si on considère une perte de 20% et une exclusion des animaux de 10%) pour démontrer des résultats significatifs.

Afin de respecter la règle des 3R, le nombre de rats utilisés sera réduit au minimum permettant de déterminer de manière fiable, robuste et statistique l'effet thérapeutique des approches proposées. L'étape *in vitro* nous permettra ainsi de remplacer l'utilisation d'animaux et d'optimiser le produit thérapeutique.

Pour limiter la douleur et la souffrance des animaux, l'ensemble des procédures seront effectuées sous anesthésie générale

et les rats seront surveillés via une grille d'évaluation, avec des points limites définis, afin de pouvoir prendre en charge précocement toute douleur ou souffrance selon les scores obtenus. Des antalgiques sont prévus et un niveau de souffrance trop élevé entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal (injection IP d'euthasol 140 mg/kg sous anesthésie générale gazeuse). De plus, des techniques peu invasives (évaluation de la fonction cardiaque par imagerie et administration du traitement par injections guidées par l'échographie) seront mises en place pour réduire le stress et la douleur.

Toutes ces attentions particulières portées au bien-être animal seront complétées par un hébergement adapté c'est-à-dire avec des congénères et avec des éléments d'enrichissement dans leurs cages (cubes de bois à ronger, abris et substrats pour la construction de nids).

A terme, les résultats de ce projet permettront de déterminer les mécanismes à l'origine des effets cardio-protecteurs de l'administration dans le myocarde de vésicules extracellulaires et d'améliorer cette thérapie « vésiculaires » en optimisant leur administration via un biomatériau contrôlant leur libération dans le tissu cible.

16378 Le projet : Les cancers primitifs du foie (carcinome hépatocellulaire et cholangiocarcinome) représentent 7000 et 2000 nouveaux cas par an en France. Ce sont deux tumeurs de très mauvais

pronostic. Les traitements curatifs (ablation de la tumeur, transplantation du foie) ne peuvent être proposés qu'à un nombre restreint de patients (40%).

Cependant, l'efficacité des traitements curatifs est grevée par la récurrence tumorale liée à la dissémination métastatique ou à l'émergence d'une nouvelle tumeur si le foie malade cirrhotique est laissé en place. Il n'existe pas de traitement de prévention de la récurrence. Les patients ayant un CHC non opérable bénéficient depuis 2008 d'un traitement systémique palliatif, le sorafenib, mais son efficacité est limitée et l'émergence de résistances est rapidement objectivée. Aucun traitement palliatif montrant un bénéfice sur la survie ne peut être proposé aux patients ayant un cholangiocarcinome non opérable.

Dans ce contexte, la recherche que nous menons a pour objectif de caractériser et quantifier l'activité de nouvelles thérapies (médicaments, traitement physique) pour le traitement des tumeurs hépatiques. La preuve d'activité/efficacité anti-tumorale des nouvelles thérapies sera faite au préalable *in vitro* sur des lignées humaines de carcinome hépatocellulaire ou de cholangiocarcinome. Des évaluations seront ensuite conduites *in vivo* dans le modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules de cancer hépatique chez la souris immunodéprimée (demande déjà autorisée). Cependant, certaines thérapies pourraient s'avérer aussi efficaces pour limiter la dissémination métastatique et le modèle de xénogreffe sous-cutanée ne permet d'étudier cet aspect.

Aussi, nous souhaitons pour nos études développer un modèle de xénogreffe orthotopique dans le foie chez la souris immunodéprimée. L'utilisation d'un modèle murin de xénogreffe orthotopique de cellules cancéreuses du foie se justifie à double titre : tout d'abord, il permet de recréer au plus près l'environnement dans lequel prolifèrent les cellules tumorales. Deuxièmement, il permet d'analyser la capacité des cellules tumorales à métastaser et permet donc d'étudier l'efficacité des thérapies sur la dissémination métastatique. Ce modèle est plus « lourd » d'un point de vue chirurgical que le modèle de greffe en sous-cutanée et sera donc utilisé sur un nombre beaucoup plus restreint d'animaux.

Dans ce modèle, nous étudierons les traitements pour lesquels nous aurons montré au préalable *in vitro* un effet sur les capacités proliférative/migratoires et invasives des cellules cancéreuses. Afin que le bien-être animal soit au mieux respecté, des critères précis d'interruption du protocole par euthanasie seront définis.

Les animaux :

* Type : Souris (*Mus musculus*) modèle de xénogreffe chez la souris immunodéficente.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 828 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 et le traitement des cancers du foie 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.

Nous mettrons en place une étude pilote réalisée sur des groupes de 5 individus afin de déterminer les conditions optimales du traitement qui sera ensuite appliqué sur les groupes expérimentaux constitués de 8 souris.

*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.).

16379 Le furet est apparu dans les foyers français dans les années 1980. Plus de vingt ans plus tard, il se classe juste derrière le chat et le chien en animal de compagnie préféré.

L'engouement pour ce petit mammifère a alors entraîné une prise en charge médicale progressive et de nombreux services se sont développés.

Ce mammifère est néanmoins sujet à certaines pathologies tant digestives, cutanées ou endocriniennes. Ces dernières peuvent engendrer une anémie sévère, nécessitant parfois une transfusion.

Après prélèvement du furet donneur, il est cependant conseillé de ne pas conserver le sang total au delà de sept jours afin de garantir l'efficacité de la transfusion.

L'étude consiste à mettre en place un protocole de stockage de sang de furet sous forme de concentré érythrocytaire et d'évaluer sa conservation, ainsi que l'évolution des paramètres biochimiques et hématologiques.

Aucune donnée n'est actuellement disponible sur la conservation des concentrés érythrocytaires dans cette espèce et permettrait si les résultats sont concluants de créer une nouvelle forme de conservation du sang, qui pourrait même s'étendre à la création d'une banque de sang pour furet.

Pour cette étude, 4 furets mâles seront utilisés. La durée de l'étude sera de 6 mois sur la partie prélèvements sanguins sur les animaux.

Pour la mise au point d'un protocole adapté à l'espèce, il n'est pas possible de remplacer les furets par d'autres animaux ni d'utiliser un autre type de prélèvement que du sang frais de manière à se rapprocher autant que possible des conditions mises en oeuvre dans le cas des transfusions. Les prélèvements seront réalisés sous anesthésie générale afin de réduire le stress subi par les animaux et le nombre extrêmement réduit de 4 animaux est le minimum qui nous permettra de détecter une variance éventuelle de la qualité du sang ainsi que de mettre au point les aspects techniques. Les animaux seront hébergés en liberté et en groupe dans une pièce de 18 m² et adoptés à la fin de l'étude dans toute la mesure du possible.

16380 La Neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie génétique (1/3000 naissances) invalidante et incurable due à des mutations du gène NF1. Tous les patients NF1 développent à l'adolescence, des tumeurs bénignes des gaines nerveuses au niveau de l'innervation de peau (neurofibromes cutanés ; cNFs) et dont le nombre peut atteindre des milliers. De plus, une partie d'entre eux développeront des neurofibromes plexiformes (pNF) des nerfs profonds qui, dans certains cas peuvent évoluer en tumeurs malignes (MPNSTs). Enfin, d'autres symptômes tels les lésions osseuses et de l'œil, le retard d'apprentissage et troubles de cognition ou encore l'hyperpigmentation de peau accompagnent parfois cette pathologie. Malgré des avancées substantielles qui ont été réalisées en grande partie grâce à l'élaboration des modèles animaux qui miment certains aspects de cette maladie, il n'existe aucun traitement efficace pour prévenir ou bloquer l'apparition de ces symptômes.

Notre équipe a élaboré un modèle de souris chez lesquelles le gène NF1 a été spécifiquement invalidé dans une population particulière des cellules gliales appelées les capsules frontales (Nf1 KO). Chez ces animaux la mutation de NF1 est accompagnée de l'expression d'un marqueur fluorescent (Tomato), ce qui permet d'identifier les cellules mutantes même chez l'animal vivant. Ces animaux développent des neurofibromes dont la localisation et la composition cellulaire récapitulent ceux des patients NF1. Leur analyse nous a conduit à réaliser plusieurs découvertes. Tout d'abord, alors que dans notre modèle les neurofibromes cutanés sont généralement détectés autour d'un an, de nombreuses micro-tumeurs sont présentes plusieurs mois avant dans la peau des mutants et évoluent en neurofibromes matures. Ensuite, le trauma de peau accélère la transformation des micro-neurofibromes en neurofibromes matures. Ce phénomène a été observé au niveau de la lésion, mais également à

distance ce qui suggère l'implication des molécules inflammatoire diffusibles, dans leur développement. Enfin, nous avons découvert une population particulière de cellules gliales dans la peau, dites glie sub-épidermique, au niveau des terminaisons nerveuses de peau et qui seraient à l'origine des neurofibromes cutanés. Récemment, nous avons découvert que chez environ 60% des souris mutantes, les neurofibromes plexiformes se transforment spontanément en MPNSTs. Plus encore, nous avons observé que comme chez des patients NF1, cette transformation passe par un état de transition, dite dysplasique qui reste mal caractérisé, mais nous paraît d'importance capitale pour le diagnostic précoce. L'ensemble de ces découvertes ouvre la voie à des travaux innovants permettant une meilleure compréhension de cette pathologie et le développement des nouvelles thérapies. C'est la vocation de cette étude. Le projet inclus 7 parties indépendantes à savoir :

1. Explorer l'efficacité du traitement topique avec Binimetinib (molécule déjà utilisé en clinique et qui bloque les cibles de NF1) pour prévenir, bloquer ou régresser le développement des cNFs (80 souris)
2. Identifier et caractériser des marqueurs de glie sub-épidermique, cellules potentiellement a l'origine des neurofibromes cutanées (24 souris)
3. Déchiffrer l'impact d'inflammation sur le développement des neurofibromes et leur transformation maligne (44 souris)
4. Élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la transformation maligne des neurofibromes (60 souris)
5. Explorer la technologie des ultrasons (FUS) pour la détection précoce des neurofibromes cutanés (20 souris)
6. Concevoir et caractériser le nouveau modèle murin de transformation des neurofibromes plexiformes en MPNSTs (40 souris)
7. Analyser les mécanismes responsables des troubles d'apprentissage au moyen du modèle murin Nf1 KO (36 souris)

Cette etude fait appel a l'utilisation de 304 souris.

La stratégie de conception des expériences a pour vocation de répondre a des questions clés liés à cette maladie afin de développer des nouveaux traitements tout en respectant la règle de 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner). Pour la Réduction ; Le nombre et le génotype des souris qui seront utilisées dans chaque procédure a été défini en prenant en compte : (i) les variations phénotypiques (toutes les souris mutantes ne développerons pas spontanément des tumeurs) entre animaux de même génotype, (ii) la fréquence d'évolution spontané (60% des cas) des neurofibromes bénins en tumeurs malignes, (iii) les données bibliographiques qui portent sur des expériences similaires, (iv) les discussions avec des cliniciens spécialistes de la NF1. Pour le Remplacement ; il s'agit de l'unique modèle animal qui récapitule le développement des neurofibromes et leur transformation maligne. Les études décrites dans ce projet ne peuvent être donc accomplies avec un autre modèle in ou ex vivo. Pour le Raffinement ; Pour éviter la douleur post-opératoire, les souris recevront l'injection (IP) de Buprenorphine avant le réveil. En cas de signe manifeste de douleur ou de souffrance avérée (prostration, isolement, léthargie, perte de poids supérieure à 10% en 24h, poil hérissé, croissance tumorale rapide) les souris subiront la mise à mort compassionnelle.

16381 Dans un contexte d'urbanisation en augmentation constante qui expose les populations citadines à une sédentarité et une alimentation hyperénergétique chroniques, la prévalence du syndrome métabolique (SMet) associé à l'obésité et au diabète de type 2, n'a cessé d'augmenter ces dernières années, et représente aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Le Smet rassemble un nombre important de complications métaboliques et comorbidités : dyslipidémie, stéato-hépatite non alcoolique (NASH), fibrose hépatique, hypertension, néphropathie, athérosclérose et dysfonction cardiaque. Ainsi le Smet augmente significativement le risque cardiovasculaire et contribue au fait que les maladies cardiovasculaires soient les premières responsables de la mortalité dans le monde. Au-delà des recommandations nutritionnelles, les traitements pharmacologiques disponibles présentent malheureusement des effets trop limités pour réduire plus significativement le risque cardiovasculaire. C'est pourquoi les études sur l'efficacité et le mécanisme d'action de nouvelles molécules

thérapeutiques ciblant l'obésité/diabète de type 2 et les comorbidités associées font l'objet de recherches importantes en raison du manque de traitements efficaces.

Les rongeurs mâles tels que les rats, souris et hamsters développent facilement une obésité et les comorbidités associées lorsqu'ils sont nourris avec des régimes gras de manière reproductible et répétable et sont donc des modèles de choix pour l'étude du Smet. En outre, des modèles animaux génétiquement modifiés, tels que les rats et souris obèses et/ou diabétiques du fait d'une mutation sur la leptine ou son récepteur permettent également d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour réduire le nombre d'animaux, les molécules à potentiel thérapeutique sont préalablement testées *in vitro* (Remplacer : sélection de molécules avec potentiel thérapeutique *in vitro*). Une fois les molécules sélectionnées, des études *in vivo* pourront alors évaluer l'impact de ces molécules en utilisant un nombre réduit d'animaux nécessaire pour rendre le résultat statistiquement fiable (Réduire : nombre d'animaux par groupe nécessaire au pouvoir statistique). Les procédures décrites dans ce projet sont choisies et réalisées de manière éthique pour réduire ou éliminer la douleur des animaux. La douleur et le stress sont associés au comportement, (le toilettage, l'exploration de l'environnement, le mouvement de l'animal) et au poids de l'animal. Tout changement de comportement sera considéré comme un déconfort, stress et/ou douleur et des mesures de correction seront prises immédiatement, telles que l'administration d'analgésique quand cela est possible, l'identification de la blessure et son traitement ; dans le cas contraire l'animal sera sacrifié. Le suivi clinique inclut également une pesée des animaux au moins une fois par semaine ; si une perte de plus de 20% du poids initial est détecté, l'animal doit être sacrifié immédiatement. Tous les animaux sont hébergés dans des cages dont les dimensions sont adaptées à l'espèce, à sa taille et à la quantité d'animaux hébergés, et qui contiennent des matériaux d'enrichissement conformément à la législation européenne (Raffiner : méthodologies utilisées pour détecter les points limites et les critères d'interruption). Les personnes responsables du traitement et des soins des animaux sont formées et sensibilisées pour éviter le stress des animaux. Ceux-ci sont contrôlés quotidiennement afin de détecter rapidement tout état clinique anormal. Les problèmes constatés lors des observations quotidiennes sont répertoriés (tels que la perte de poids, le manque de toilettage, l'agressivité, l'immobilité, etc.) et systématiquement passés en revue par les membres de la structure de protection des animaux (SBEA). Le vétérinaire est consulté pour la mise en œuvre de mesures correctives et d'améliorations. Lorsque cela s'avère nécessaire, les procédures correctives afin de protéger les animaux sont réalisées immédiatement. Par exemple, s'il y a des animaux blessés en raison de l'agressivité d'un individu, nous identifions immédiatement l'agresseur qui est isolé, alors que pour les autres individus les blessures sont immédiatement soignées. Si l'atténuation des souffrances n'est pas observée, l'animal est sacrifié selon des procédures appropriées (anesthésie suivie d'une dislocation cervicale). Pour les chirurgies, des analgésiques pré et postopératoires seront administrés aux animaux.

Tous les modèles ont été développés avec un groupe traité avec une molécule de référence, ce qui permet de valider le nombre d'animaux nécessaires pour démontrer l'efficacité des molécules testées. Sur la base de publications scientifiques, un écart-type d'environ 25 % a été estimé pour la plupart des expériences réalisées, en utilisant un test statistique de type ANOVA Dunnet à 1 ou 2 voies avec un post-test Bonferroni. Avec un nombre final d'animaux égal à 10 par groupe de traitement, une différence de +/- 30% est théoriquement détectable avec une probabilité de 80% à $p < 0,05$. Ces éléments permettent de limiter le nombre d'animaux nécessaires pour chaque étude. Dans l'ensemble, un total de treize mille animaux sera utilisé : (plus précisément : Souris 2000 ; Rats 100 ; Hamsters 500 par an).

16382 En vieillissant le système immunitaire se dégrade. L'immunosénescence est marquée par une perte de l'efficacité des cellules immunitaires dans la réponse suite à la reconnaissance des pathogènes. En effet les macrophages ont des capacités migratoires réduites chez les sujets âgés, ils produisent également moins de médiateurs pro-inflammatoires en réponse à un antigène. En plus d'une baisse significative de leur prolifération, les lymphocytes présentent une réponse inadéquate aux antigènes qu'ils rencontrent, ce qui augmente la susceptibilité aux infections. Il est noté une accumulation de lymphocytes mémoires au détriment de cellules naïves capables de détecter de nouveaux agents infectieux. La production d'anticorps par les cellules immunitaires est également affectée : même si leur

quantité reste constante au cours de la l'évolution, les sujets âgés produisent des anticorps d'affinité réduite ce qui contribue à l'augmentation de la susceptibilité aux infections. Ceci explique pourquoi les personnes âgées sont plus sensibles aux infections et que l'efficacité vaccinale est réduite.

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. Ce projet vise à étudier l'effet immunomodulateur de composés sur l'immunité vaccinale. Pour cela des souris jeunes et des souris adultes seront traitées avec des candidats médicament, puis recevront le vaccin contre la grippe saisonnière. La réponse immunitaire suite à cette immunisation sera analysée. Ce projet comportera 600 souris sur sa totalité.

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 (association française des sciences et techniques de l'animal de laboratoire), 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.

16383 Objectifs : Ce projet a pour objectif d'encadrer les procédures liées au développement d'un produit vétérinaire antiparasitaire à visée curative et/ou préventive, incluant les produits à activité répulsive, en vue de son Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) ou ajout d'une indication.

Dans le cadre d'un développement, des études préliminaires pourront être conduites sur des modèles animaux (rongeurs) et sur les espèces de destination du produit, telles que le chien et le chat, afin de démontrer l'efficacité de ces produits conformément aux textes réglementaires et lignes directrices en vigueur.

Ces produits peuvent être à action topique et/ou systémique. Les voies (ex : oral, topique, injectable) et modes d'administration peuvent varier (ex : collier, pipette, seringue, spray).

Les études d'efficacité de produits vétérinaires antiparasitaires sont principalement basées sur la comparaison de niveaux d'infestation chez des animaux traités avec le produit vétérinaire en développement et des animaux témoins non traités.

Avantages/dommages : L'innovation au services des animaux : Développement de nouveaux produits présentant un bénéfice pour la santé et le bien-être des animaux et indirectement de leurs propriétaires dans le cadre de la lutte contre les parasites externes et internes.

Les dommages induits par les procédures peuvent être du stress, de l'inconfort ou une gêne liée aux interventions répétées (ex : infestations, comptage, anesthésies) en particulier chez les animaux du groupe témoin. Les animaux sont porteurs de parasites sur une période réduite, limitant l'installation prolongée du parasite et l'apparition de signes cliniques. Ces signes sont légers à modérés et sont généralement transitoires et réversibles.

Informations sur les espèces utilisées : Une étape préliminaire de sélection peut être effectuée *in vivo* sur modèle animal, ici des rongeurs porteurs de parasites identiques à ceux de l'espèce de destination, afin d'affiner la sélection et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés in fine.

L'efficacité du produit sélectionné doit être évaluée et démontrée chez l'espèce de destination (chien et/ou chat) dans le cadre d'études règlementaires. Le nombre d'études et le nombre d'animaux par étude sont basés sur : les connaissances acquises sur la littérature scientifique, l'expérience acquise

des études précédentes, une analyse statistique ainsi que les textes réglementaires et lignes directrices.

Sur l'ensemble du projet et sur une durée de 5 ans, jusqu'à 240 souris, 300 gerbilles, 500 chiens et 400 chats pourront être utilisés en fonction des produits antiparasitaires à développer.

Mise en œuvre des 3R's : Remplacement : Afin de réduire au maximum l'utilisation de l'animal, une première sélection de molécules parasitocides est effectuée *in vitro*, par contact direct avec des parasites semblables aux parasites affectant les animaux cibles.

Les études *in vivo* permettent d'évaluer l'efficacité et l'innocuité des produits pharmaceutiques vétérinaires chez l'espèce de destination. En effet, le produit vétérinaire étant administré à l'animal (hôte) et non au parasite, les études *in vitro* seules ne peuvent prédire l'efficacité du produit sans évaluation chez l'espèce de destination.

Dans certain cas, un modèle rongeur reconnu d'infestation peut être utilisé pour l'évaluation préliminaire de l'efficacité de principes actifs à visée antiparasitaire. Quand cela est possible, ce modèle est donc une alternative à la sélection de principes actifs sur l'espèce cible.

Réduction : L'effectif minimum est généralement définis dans les lignes directrices et déterminé (bibliographie, directives, historique, définition des objectifs...) de façon à limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en garantissant une approche rigoureuse et ceci afin de répondre aux objectifs scientifiques de l'étude.

D'autre part, les lignes directrices permettent d'établir des protocoles d'étude d'efficacité *in vivo* permettant de répondre à l'objectif scientifique et limiter l'usage additionnel d'animaux.

Lorsque cela est possible, des données issues du développement de produits ayant une AMM avec un principe actif identique peuvent permettre de limiter le nombre d'études nécessaires au développement d'un nouveau produit.

Raffinement : Pour chaque étude, une période d'acclimatation systématique des animaux est prévue dans le but de les habituer aux conditions de l'étude afin de limiter leur stress. Des points limites et un suivi adapté, effectués par un personnel compétent, sont mis en place afin de prendre en charge les animaux le plus rapidement et efficacement possible en cas de signes cliniques pouvant potentiellement entraîner une douleur chez l'animal. Les signes cliniques connus liés aux procédures sont anticipés et pris en charge rapidement par le vétérinaire référent ou le personnel qualifié, avec la mise en place de soins appropriés ou le retrait de l'animal de l'étude (arrêt de la procédure).

Les conditions d'hébergement, répondant à la réglementation en vigueur, sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour garantir leur confort et leur bien-être.

Les animaux ont accès à des dispositifs d'enrichissement afin de stimuler l'exercice physique et leur activité cognitive.

La Structure en charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour le bien-être des animaux.

16384 Le vieillissement cardiovasculaire constitue un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires, plus de 80% de la mortalité cardiovasculaire survient chez des individus âgés de plus de 65 ans. Un effet protecteur au niveau cardiovasculaire des acides gras polyinsaturés oméga-3 a été démontré par certaines études notamment par les médiateurs lipidiques qui dérivent de ces acides gras oméga-3 dont fait partie la résolvine D2.

Dans le but d'étudier les mécanismes qui entrent en jeu, nous nous focaliserons sur l'étude de la résolvine D2 (RvD2) ainsi que de son récepteur spécifique : le récepteur GPR18. Les informations transmises par la fixation de la résolvine D2 à son récepteur GPR18 engendrent l'envoi d'informations à l'intérieur de la cellule qui agiront sur différents paramètres cellulaires (prolifération, migration, ...). Ainsi, la dérégulation d'un ou plusieurs de ces paramètres est observée dans les pathologies cardiovasculaires et le vieillissement. Il existe des outils pharmacologiques pour étudier les effets d'une inhibition du récepteur GPR18. En effet, un agent de synthèse bloquant spécifiquement l'action de la résolvine D2 sur GPR18, le O-1918 peut être utilisé *in vivo* et *in vitro*. Notre objectif est d'étudier l'effet

activateur (administration de résolvine D2) et/ou inhibiteur (traitement par O-1918) de GPR18 sur le développement d'une pathologie vasculaire, l'athérosclérose chez la souris.

Pour cela, nous utiliserons 64 souris n'exprimant pas l'apolipoprotéine E nourries avec un régime riche en graisses et en sucre pendant 4 semaines qui débutera à l'âge de 8 semaines (procédure 1). Ceci est considéré comme un bon modèle d'athérosclérose ainsi qu'un modèle de vieillissement vasculaire accéléré. Cette souche de souris exprime naturellement le récepteur GPR18. Au moment du début du régime, les animaux seront répartis aléatoirement en 4 groupes de 16 souris : contrôle, résolvine D2, O-1918 et résolvine D2 + O-1918. Les 2 composés (résolvine D2 et O-1918) seront dilués dans une solution saline et chaque groupe recevra une injection de solution saline (contrôle) ou des composés seuls ou en combinaison par voie intra-péritonéale, 3 fois par semaine durant 4 semaines (Procédure 2). Des paramètres du métabolisme glucidique (la tolérance au glucose, procédure 3, sur 8 souris de chaque groupe et la sensibilité à l'insuline, procédure 4, sur les 8 autres souris de chaque groupe n'ayant pas subi la procédure 3) seront mesurés, 4 jours avant la fin des 4 semaines de régime et de traitement. De plus, les paramètres hémodynamiques et mécaniques de la paroi artérielle (Procédure 5) seront mesurés à la fin des 4 semaines de traitement sur les 64 souris sous anesthésie profonde à l'isoflurane. Après ces enregistrements, le sang est prélevé à partir du cathéter déjà placé dans la carotide gauche pour la procédure 5. Les animaux sont ensuite mis à mort par injection intra péritonéale d'Exagon (400 mg/Kg/IP). La mort est vérifiée par l'absence de battements cardiaque et l'absence de reflexes. Les organes seront prélevés pour des analyses histologiques et moléculaires pour l'étude du développement de la maladie et la signalisation du récepteur GPR18. Les organes sont récupérés après la mise à mort par injection d'exagon (400 mg/Kg/IP).

Dans cette étude, il est prévu d'utiliser 64 souris

Chaque lot sera divisé en 4 groupes (avec 16 souris par groupe) :

Groupe 1 : groupe contrôle (solution saline + éthanol/IP)

Groupe 2 : résolvine D2 (100 ng/souris de 25g/IP) en solution saline + éthanol

Groupe 3 : O-1918 (2 mg/kg/IP) en solution saline + éthanol

Groupe 4 : O-1918 (2 mg/kg/IP) + résolvine D2 (100 ng/souris de 25g/IP) en solution saline + éthanol dans la même injection

Dans le cadre du respect de la règle des 3R :

-Réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux, plusieurs types de mesures (procédures 3 et 5 ou 4 et 5) seront effectuées sur un même animal. 16 animaux par groupe sont nécessaires afin de ne pas compromettre les objectifs du projet et de pouvoir réaliser la procédure 3 (8 animaux par groupes) et la procédure 4 (8 animaux) dans de bonnes conditions d'analyses statistiques. Des tests statistiques non paramétriques adaptés pour des petits effectifs seront utilisés pour analyser les données.

-Raffinement :

Les souris seront hébergées de 2 à 5 par cages ventilées. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé et bâtonnets de bois.

Procédure 1 : Nous n'attendons pas d'effet du régime sur 4 semaines hormis une prise de poids légère ou modéré. Le temps de traitement ne devrait pas induire d'insulino résistance ou d'hyperglycémie ou bien très précoce. Si toutefois une perte de poids trop importante due à un refus d'alimentation (très peu probable) est constatée, l'animal sera remis sous régime normal.

Procédure 2 : pour le groupe 4, l'injection de la résolvine D2 et du O-1918, les 2 produits seront mélangés dans la même seringue pour réduire le nombre d'injection par animal. De manière générale, nous respecterons une alternance des sites d'injection (droite puis gauche) pour réduire la douleur. Si des signes de douleur (fuites, agressivité, dos voûté, piloérection, oreilles rabaisées vers l'arrière) liées à l'injection en intra péritonéales répétées sont observés, on peut faire une injection en sous-cutanée de buprénorphine (0,05 à 0,1 mg/kg) (durée prévisionnelle d'analgésie 3 à 5h). En cas d'aggravation l'animal sera sorti de l'étude avec un arrêt du régime et des injections intra péritonéales. Les signes perte de poids de 20% sur une semaine, yeux fermés, dos voûté, poil hérissé, immobilité ou prostration, pouvant être liés à des complications type péritonite par perforation intestinale, hémorragie, lésion d'un organe suite aux injections intra péritonéales répétées ne sont pas attendus

puisque les gestes seront pratiqués par des personnels expérimentés. S'ils survenaient exceptionnellement, l'animal sera mis à mort par injection d'exagon (400mg/kg/IP).

Procédure 3 et 4 : la zone d'incision superficielle à la queue pour récupérer les microgouttes de sang sera surveillée. Si une infection ou si un comportement de grattage ou de léchage exagéré apparaît, la plaie sera désinfectée 2 fois par jour et un anti-douleur local sera administré (lidocaïne, badigeons). Les souris ne restent en vie que 4 jours après ce protocole.

Procédure 5 : la température corporelle et la fréquence cardiaque seront monitorées en permanence. Un ajustement de la température et de l'anesthésiant peut-être réalisé à tout moment.

- Remplacement : impossible pour le moment car en prévision d'utiliser la résolvine D2 comme thérapeutique, il est obligatoire d'étudier la molécule et son récepteur *in vivo* dans un premier temps.

16385 L'incontinence urinaire est un terme qui regroupe toutes les fuites involontaires d'urine. L'incontinence n'est pas toujours la même, et il existe des causes différentes pour l'incontinence masculine, féminine, chez les personnes âgées et chez les enfants. La quantité d'urine lors d'une perte involontaire varie également. Il existe donc plusieurs types d'incontinence urinaire, comme l'incontinence d'effort, l'incontinence mixte, l'incontinence par impériosité. Cette dernière désigne l'incontinence liée au besoin urgent d'uriner, qui souvent ne laisse pas le temps de se rendre aux toilettes. Les mictions sont très fréquentes, de jour comme de nuit. Même s'ils ne vont pas jusqu'à la fuite, ces besoins impérieux et fréquents sont très handicapants. Cette forme d'incontinence affecte aussi bien l'homme que la femme avec une forte prédominance chez l'enfant et la personne âgée. L'incontinence réduit beaucoup la qualité de vie, provoquant gêne, isolement et dépression. L'incontinence est souvent une des raisons pour lesquelles les personnes âgées nécessitent de recevoir des soins dans des établissements de soins à long terme. Les personnes âgées souffrant d'incontinence courent de grands risques de chutes et de fractures lorsqu'elles se pressent pour aller aux toilettes. Les médicaments les plus utilisés pour le traitement de l'incontinence urinaire font partie de la classe des anticholinergiques. Ces médicaments toutefois sont mal tolérés à cause des effets secondaires, tels que constipation, sécheresse buccale, vision trouble et parfois même confusion mentale, effets qui sont particulièrement gênants chez les personnes âgées. Ces dernières années d'autres médicaments ont été proposés mais leur efficacité est encore en cours d'évaluation. Il existe donc un besoin médical important pour la mise à disposition de nouveaux médicaments ayant plus d'efficacité et moins d'effets secondaires. Le but de ce projet est de tester des candidats médicaments dans un modèle expérimental d'incontinence urinaire chez le rat. Des rats adultes seront traités pendant 1 semaine avec un médicament diurétique afin d'augmenter considérablement le nombre de mictions spontanées par jour. Ce modèle expérimental mime donc la pathologie humaine à la différence d'autres modèles couramment utilisés, en particulier chez le rat, le lapin ou le chien. Afin d'étudier les effets *in vivo* des candidats médicaments, les rats seront placés dans des cages métaboliques pendant 48 heures. Ces cages sont conçues de façon à laisser passer les urines en bloquant totalement les fèces. Cela nous permettra de tester l'effet des candidats médicaments sur les mictions pendant la phase active (la nuit) et la phase de repos (le jour). Ce système non-invasif de test de la fonction de la vessie urinaire représente un gros avantage par rapport aux protocoles expérimentaux utilisés couramment. Notre protocole expérimental respecte donc le principe des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux ; en effet, le design de l'étude étant 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 en fonction du nombre de molécules à tester. Pour ce qui concerne le critère de remplacement, les tests *in vitro* ne sont malheureusement pas probants, donc l'utilisation des rats est indispensable pour notre but. Par contre le rat remplace le chien ou le lapin comme modèle expérimental. Enfin, pour ce qui est du critère de raffinement, nous proposons d'utiliser un modèle non-invasif, qui réduit fortement la souffrance animale. En effet, les modèles de la littérature utilisent des rats éveillés ou anesthésiés ayant subi auparavant la pose d'un cathéter dans la vessie. Le suivi quotidien des animaux permettra d'identifier tout signe de douleur ou de souffrance nécessitant une intervention la plus précoce possible. Les rats seront pesés 2 fois par semaine. La manipulation des animaux et le gavage seront effectués exclusivement par du personnel ayant la formation nécessaire. Un enrichissement du milieu dans les cages sera mis en place. Lors des expériences dans les cages

métaboliques, afin de réduire le stress, les animaux seront en contact visuel et olfactif entre eux. Ce projet nécessite l'utilisation de 1920 rats sur 5 ans.

16386 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 thérapeutiques et diagnostics doivent donc se poursuivre. Parmi les dernières thérapies développées, l'immunothérapie se distingue avec une bonne efficacité pour la prise en charge de maladies liées aux cancers et présente de faibles toxicités par rapport aux chimiothérapies anticancéreuses. Cependant, des phénomènes de résistances aux traitements apparaissent et la croissance tumorale reprend. Afin de remédier à cela, différentes techniques de diagnostic ont été mises au point se basant entre autres sur l'imagerie non-invasive ou les biopsies. Notre projet vise à évaluer une de ces techniques de diagnostic. De ce fait, le recours à l'utilisation de l'animal est indispensable pour étudier une maladie comme le cancer et la complexité des interactions avec son environnement. Deux raisons à cela :

- 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).

- 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)

Le traitement par immunothérapie a pour but de restaurer la réponse immunitaire. Cette réponse est influencée par des signaux stimulateurs et inhibiteurs. Dans certains cas, ces signaux peuvent conduire à reprise de la croissance tumorale.

Notre but est d'étudier l'apparition et l'évolution des biomarqueurs de la résistance tumorale impliqués dans l'échappement aux traitements par immunothérapie à l'aide de techniques comme l'imagerie, la cytométrie en flux et de l'immunohistochimie chez des souris présentant un cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Le projet comporte différentes étapes : 1) Evaluation de l'efficacité du traitement par immunothérapie sous forme de courbe de survie, 2) Quantification des biomarqueurs de la maladie et des phénomènes de résistances par cytométrie en flux, 3) Qualification des biomarqueurs de la résistance tumorale par immunohistochimie. Ces étapes décriront l'évolution de la maladie, l'influence du traitement et l'apparition de phénomènes de résistances, 4) Une étude préliminaire par imagerie de fluorescence afin d'apprécier le temps développement de la tumeur dans le modèle murin et d'apprécier la cinétique d'apparition de biomarqueur du microenvironnement tumorale.

Ce projet sera ensuite suivi d'un autre projet ciblé sur l'imagerie scintigraphique dont les paramètres dépendront des résultats des diverses phases de notre projet (histologie, cytométrie et imagerie de fluorescence).

Il est prévu d'utiliser 120 souris C57BL/6 sur une période de 3 ans afin d'étudier l'évolution de biomarqueurs du microenvironnement tumoral et les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'échappement thérapeutique.

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 10 animaux par groupe permettant ainsi une comparaison statistique satisfaisante.

- 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. Le recours à des analgésiques est prévu si les animaux présentent des signes de douleurs.

16387 *Mycobacterium avium* est un pathogène respiratoire chez les patients porteurs de bronchopathies chroniques obstructives mais également responsable de bactériémie et de maladie disséminée chez les patients immunodéprimés. Bien que la clarithromycine soit une molécule incontournable dans le traitement de ces pathologies, le traitement reste complexe (polythérapies), long (9-12 mois), à faible niveau de preuve et souvent très mal toléré. A ce jour le traitement optimal (choix des molécules, nombre de molécules à utiliser, durée du traitement...) n'est pas défini et de nouveaux antibiotiques potentiellement susceptibles de raccourcir le traitement n'ont pas été testés cliniquement faute d'étude préclinique. De plus, on note l'émergence de souches résistantes aux macrolides et de nouvelles molécules actives sont donc nécessaires. Il a été récemment décrit que l'utilisation d'un modèle murin d'infection pulmonaire reproduisait l'effet bénéfique de la clarithromycine et certaines associations semblaient prometteuses dans cette indication. Le choix des molécules, le nombre de molécules à utiliser et la durée optimale de traitement reste à définir d'abord sur un modèle murin qui pourra ensuite guider les essais cliniques.

Aussi nous proposons une étude expérimentale comparant 3 durées de traitement (6, 9 et 12 mois - cette dernière étant la durée standard-) et 4 bras de traitement différent (bras standard - clarithromycine (CLR)+rifampicine (RIF)+éthambutol (EMB)), le remplacement de la RIF par la clofazimine (CFZ), l'ajout au bras standard de CFZ et un dernier bras sans traitement). La CFZ est un ancien antiléprosy avec une activité antimycobactérie dont le regain d'intérêt est lié à la multirésistance. Une précédente étude (publiée) nous a permis de montrer que la CFZ a une action synergique avec la CLR. Les 2 bras les plus efficaces ont été retenus pour cette étude.

La méthodologie utilisée pour évaluer l'efficacité stérilisante d'un traitement n'est pas uniquement la stérilisation des poumons en fin de traitement mais l'absence de rechute microbiologique 3 mois après la fin du traitement.

Il faut savoir que l'infection à *M. avium* n'est pas mortelle pour la souris et que cette espèce, contrairement à l'homme immunodéprimé, contrôle très bien et très longtemps l'infection. En revanche la souris ne guérit pas plus vite que l'homme et n'élimine pas la bactérie de manière naturelle. Il est donc nécessaire de traiter la maladie expérimentale aussi longtemps chez la souris que chez l'homme.

Il est prévu d'utiliser 190 souris, 3 groupes de traitement comprenant chacun entre 50 et 55 souris et un groupe contrôle comprenant 35 souris. L'étude doit durer treize mois (un mois d'incubation et 12 mois de traitement au plus).

Le calcul d'effectif des groupes a été conduit de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser en tenant compte de la possible mortalité sur cette durée d'étude. Les souris seront infectées par voie aérosol ce qui diminue le stress lié à une injection intraveineuse et améliore la reproductibilité. Il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives pour mesurer l'efficacité des combinaisons de médicaments contre cette mycobactérie qui remplacerait la souris ou qui réduirait le nombre de souris à utiliser. Les tests *in vitro* sont fiables en monothérapie et ont déjà été fait, tester les combinaisons *in vitro* est en revanche beaucoup moins fiable et non prédictif des combinaisons actives *in vivo* dans ce modèle, justifiant les études *in vivo*.

La règle des 3R sera respectée: Remplacement: quand cela est possible la non utilisation de ce modèle est fait; Réduction: le nombre minimal de souris pour montrer une efficacité a été calculé; Raffinement: nourriture ad libitum, litières enrichies et une grille d'évaluation de la souffrance des animaux sont prévus pour toute la durée du suivi. Une analyse rétrospective de la précédente étude (4 mois de gavage) n'a montré aucun effet délétère sur la souris. La même analyse est prévue ici sur cette durée plus prolongée.

16388 Le vieillissement cardiovasculaire constitue un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires, plus de 80% de la mortalité cardiovasculaire survient chez des individus âgés de plus de 65 ans. Un effet protecteur au niveau cardiovasculaire des acides gras polyinsaturés oméga-3 a été démontré par certaines études notamment par les médiateurs lipidiques qui dérivent de ces acides gras oméga-3 dont fait partie la résolvine D2.

Dans le but d'étudier les mécanismes qui entrent en jeu, nous nous focaliserons sur l'étude de la résolvine D2 (RvD2) ainsi que de son récepteur spécifique : le récepteur GPR18. Les informations

transmises par la fixation de la résolvine D2 à son récepteur GPR18 engendrent l'envoi d'informations à l'intérieur de la cellule qui agiront sur différents paramètres cellulaires (prolifération, migration, ...). Ainsi, la dérégulation d'un ou plusieurs de ces paramètres est observée dans les pathologies cardiovasculaires et le vieillissement. Il existe des outils pharmacologiques pour étudier les effets d'une inhibition du récepteur GPR18. En effet, un agent de synthèse bloquant spécifiquement l'action de la résolvine D2 sur GPR18, le O-1918 peut être utilisé *in vivo* et *in vitro*. Notre objectif est d'étudier l'effet activateur (administration de résolvine D2) et/ou inhibiteur (traitement par O-1918) de GPR18 sur le développement d'une pathologie vasculaire, l'athérosclérose chez la souris.

Pour cela, nous utiliserons 64 souris n'exprimant pas l'apolipoprotéine E nourries avec un régime riche en graisses et en sucre pendant 4 semaines qui débutera à l'âge de 8 semaines (procédure 1). Ceci est considéré comme un bon modèle d'athérosclérose ainsi qu'un modèle de vieillissement vasculaire accéléré. Cette souche de souris exprime naturellement le récepteur GPR18. Au moment du début du régime, les animaux seront répartis aléatoirement en 4 groupes de 16 souris : contrôle, résolvine D2, O-1918 et résolvine D2 + O-1918. Les 2 composés (résolvine D2 et O-1918) seront dilués dans une solution saline et chaque groupe recevra une injection de solution saline (contrôle) ou des composés seuls ou en combinaison par voie intra-péritonéale, 3 fois par semaine durant 4 semaines (Procédure 2). Des paramètres du métabolisme glucidique (la tolérance au glucose, procédure 3, sur 8 souris de chaque groupe et la sensibilité à l'insuline, procédure 4, sur les 8 autres souris de chaque groupe n'ayant pas subi la procédure 3) seront mesurés, 4 jours avant la fin des 4 semaines de régime et de traitement. De plus, les paramètres hémodynamiques et mécaniques de la paroi artérielle (Procédure 5) seront mesurés à la fin des 4 semaines de traitement sur les 64 souris sous anesthésie profonde à l'isoflurane. Après ces enregistrements, le sang est prélevé à partir du cathéter déjà placé dans la carotide gauche pour la procédure 5. Les animaux sont ensuite mis à mort par injection intra péritonéale d'Exagon (400 mg/Kg/IP). La mort est vérifiée par l'absence de battements cardiaque et l'absence de réflexes. Les organes seront prélevés pour des analyses histologiques et moléculaires pour l'étude du développement de la maladie et la signalisation du récepteur GPR18. Les organes sont récupérés après la mise à mort par injection d'exagon (400 mg/Kg/IP).

Dans cette étude, il est prévu d'utiliser 64 souris

Chaque lot sera divisé en 4 groupes (avec 16 souris par groupe) :

Groupe 1 : groupe contrôle (solution saline + éthanol/IP)

Groupe 2 : résolvine D2 (100 ng/souris de 25g/IP) en solution saline + éthanol

Groupe 3 : O-1918 (2 mg/kg/IP) en solution saline + éthanol

Groupe 4 : O-1918 (2 mg/kg/IP) + résolvine D2 (100 ng/souris de 25g/IP) en solution saline + éthanol dans la même injection

Dans le cadre du respect de la règle des 3R :

-Réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux, plusieurs types de mesures (procédures 3 et 5 ou 4 et 5) seront effectuées sur un même animal. 16 animaux par groupe sont nécessaires afin de ne pas compromettre les objectifs du projet et de pouvoir réaliser la procédure 3 (8 animaux par groupes) et la procédure 4 (8 animaux) dans de bonnes conditions d'analyses statistiques. Des tests statistiques non paramétriques adaptés pour des petits effectifs seront utilisés pour analyser les données.

-Raffinement :

Les souris seront hébergées de 2 à 5 par cages ventilées. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé et bâtonnets de bois.

Procédure 1 : Nous n'attendons pas d'effet du régime sur 4 semaines hormis une prise de poids légère ou modérée. Le temps de traitement ne devrait pas induire d'insulino résistance ou d'hyperglycémie ou bien très précoce. Si toutefois une perte de poids trop importante due à un refus d'alimentation (très peu probable) est constatée, l'animal sera remis sous régime normal.

Procédure 2 : pour le groupe 4, l'injection de la résolvine D2 et du O-1918, les 2 produits seront mélangés dans la même seringue pour réduire le nombre d'injection par animal. De manière générale, nous respecterons une alternance des sites d'injection (droite puis gauche) pour réduire la douleur. Si des signes de douleur (fuites, agressivité, dos voûté, piloérection, oreilles rabaisées vers l'arrière)

liées à l'injection en intra péritonéales répétées sont observés, on peut faire une injection en sous-cutanée de buprénorphine (0,05 à 0,1 mg/kg) (durée prévisionnelle d'analgésie 3 à 5h). En cas d'aggravation l'animal sera sorti de l'étude avec un arrêt du régime et des injections intra péritonéales. Les signes perte de poids de 20% sur une semaine, yeux fermés, dos voûté, poil hérissé, immobilité ou prostration, pouvant être liés à des complications type péritonite par perforation intestinale, hémorragie, lésion d'un organe suite aux injections intra péritonéales répétées ne sont pas attendus puisque les gestes seront pratiqués par des personnels expérimentés. S'ils survenaient exceptionnellement, l'animal sera mis à mort par injection d'exagon (400mg/kg/IP).

Procédure 3 et 4 : la zone d'incision superficielle à la queue pour récupérer les microgouttes de sang sera surveillée. Si une infection ou si un comportement de grattage ou de léchage exagéré apparaît, la plaie sera désinfectée 2 fois par jour et un anti-douleur local sera administré (lidocaïne, badigeons). Les souris ne restent en vie que 4 jours après ce protocole.

Procédure 5 : la température corporelle et la fréquence cardiaque seront monitorées en permanence. Un ajustement de la température et de l'anesthésiant peut-être réalisé à tout moment.

- Remplacement : impossible pour le moment car en prévision d'utiliser la résolvine D2 comme thérapeutique, il est obligatoire d'étudier la molécule et son récepteur *in vivo* dans un premier temps.

16389 Au cours des 50 dernières années, de nombreuses études ont permis d'objectiver l'augmentation considérable de la prévalence de l'asthme. Cette progression en fait un problème de santé publique majeur et le développement de méthodes de prévention primaire de l'asthme doit aujourd'hui constituer une priorité de santé. Les études épidémiologiques prospectives comme la cohorte européenne de nouveau-nés PASTURE (Protection Against Allergy : Study in Rural Environments) ont montré le rôle préventif joué par l'exposition aux poussières de ferme et notamment aux microorganismes associés (von Mutius et Schmid, 2006). Devant l'impossibilité actuelle de réaliser un essai thérapeutique clinique visant à "appliquer" l'environnement de la ferme à une cohorte de nouveau-nés, nous projetons de réaliser une évaluation pré-clinique pour évaluer l'effet de l'exposition néonatale au milieu fermier en utilisant le modèle animal d'asthme allergique. Dans ce modèle, les lapins sont rendus allergiques à l'ovalbumine, la principale protéine du blanc d'œuf. Ce projet a donc pour but de tester l'hypothèse selon laquelle l'exposition des lapereaux nouveau-nés à la poussière de ferme de production laitière avec un mode d'agriculture traditionnel permet d'atténuer voire d'empêcher le développement de l'hyperréactivité bronchique et tussigène associée à l'asthme allergique quand ces lapereaux sont sensibilisés et exposés à l'allergène spécifique plus tard dans leur vie. Une procédure d'hébergement spécifique des lapins dans deux fermes de production laitière avec des modes d'agriculture différents (traditionnel vs moderne) sera mise en place pendant les premières 6 semaines de vie. Un groupe témoin sera hébergé dans une zone avec un statut sanitaire spécifique (EOPS) afin de « modéliser » un environnement avec une biodiversité faible. Les lapines gestantes à une semaine de gestation (3 lapines gestantes par type hébergement, soit 9 lapines en tout) seront placées aux lieux d'hébergements spécifiques afin de s'acclimater avant la mise bas et resteront dans l'hébergement jusqu'à 6 semaines après la mise bas. A 6 semaines de vie des lapereaux, les lapereaux seront sevrés, séparés des mères, et les mères et les lapereaux seront transportés dans les locaux d'hébergement conventionnel d'un établissement utilisateur agréé. A deux mois de vie, les lapereaux seront sensibilisés à l'ovalbumine (par deux injections d'OVA espacées de deux semaines) suivi du déclenchement de l'inflammation allergique par une exposition des voies aériennes à l'ovalbumine (l'inhalation 3 fois par semaine pendant 2 semaines). Les effets sur les voies respiratoires seront évalués par la mesure de la réactivité tussigène (à l'état vigile et sous anesthésie générale) et par la réactivité bronchique (sous anesthésie générale). Cette étude nécessite 18 lapereaux par type d'hébergement, soit 63 lapins au total (53 lapereaux et 9 lapines gestantes). Dans la mesure de la conformité avec les exigences des 3 R, il n'existe pas d'étude antérieure destinée à répondre aux questions scientifiques posées dans ce protocole. Remplacement : Puisque la bronchomotricité et la toux sont les réflexes de défense et protection des voies aériennes, l'étude de la réactivité tussigène et bronchique nécessite l'utilisation d'un modèle physiologique intégré qui ne peut être remplacé par des méthodes alternatives. Le modèle lapin adulte de type Néozélandais a été choisi car c'est un modèle animal qui présente un réflexe de toux contrairement au modèle rongeur souris ou rat. Réduction : Le

mères des lapereaux et les lapereaux surnuméraires seront réutilisées dans un autre protocole de recherche. Raffinement : Après la procédure d'hébergement spécifique, l'hébergement des lapereaux sevrés se fait par 8 en box de 30000 cm² au sol, nourris ad libitum et leur environnement est enrichi de tunnels. Pendant toute la durée de projet les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne. Dans l'éventualité, bien que peu probable, de la survenue de signes de souffrance, de détresse ou d'inconfort réel (diminution ou arrêt de consommation alimentaire ou de boisson sur 48 heures, perte de poids de plus de 10% en 3 jours, prostration, difficulté de déplacement, gênes respiratoires), les mesures mises en place seraient l'arrêt des expériences, isolement, surveillance accentuée. L'animal serait mis à mort en cas de persistance dans les 72 heures ou en cas d'aggravation brutale. Pendant l'expérimentation chez l'animal anesthésié, une surveillance de la profondeur de l'anesthésie et de l'analgésie sera effectuée toutes les 15 minutes. En cas de confirmation de notre hypothèse, des analyses approfondies biologiques et microbiologiques seront réalisées. Dans ce contexte, des échantillons de poussière des deux fermes, des échantillons de sang (sous anesthésie générale), de lavage broncho-alvéolaire (post mortem) et des prélèvements histologiques de la trachée du lapin (post mortem) seront réalisés pour des analyses ultérieures. Le but de cette étude pré-clinique est d'élaborer des stratégies de prévention primaire contre l'asthme par l'exposition précoce à des substances d'origine microbienne ou non-microbienne contenues dans la poussière de ferme et de mettre en place des protocoles de prévention interventionnels chez les populations à risque.

16390 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.

16391 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie progressive caractérisée par une augmentation de la pression sanguine dans les artères pulmonaires, l'HTAP aboutit à une défaillance cardiaque fatale. Il n'existe à ce jour aucun traitement et la survie à 3 ans n'est que de 60%. Seule une transplantation pulmonaire ou cardiopulmonaire permet la guérison du patient, mais les conséquences de ce geste chirurgical sont lourdes et la survie des patients reste faible (50 % des patients sont en vie 5 ans après la transplantation). Il est donc urgent de trouver des nouvelles pistes thérapeutiques.

Des travaux récents démontrent que la cytokine pro-inflammatoire MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) joue un rôle crucial dans la mise en place et l'aggravation de la maladie chez l'Homme. En effet, cette cytokine est anormalement élevée dans le sérum des patients et contribue à la mise en place de la dysfonction endothéliale, phénomène clé de l'HTAP. Il est donc très important de mieux comprendre les origines de ce phénomène et de déterminer si MIF peut représenter une cible éventuelle pour limiter le développement de la maladie. Pour cela, nous avons déjà mis au point plusieurs techniques alternatives avec notamment la culture de cellules endothéliales pulmonaires humaines *in vitro*. Nos données confirment que les cellules endothéliales isolées à partir de patients HTAP sécrètent davantage MIF que des cellules endothéliales normales. De plus, nous avons pu voir que MIF se lie plus facilement à la surface des cellules endothéliales de patients HTAP car son récepteur CD74 est surexprimé. Cependant, à cette étape de notre projet, il nous faut démontrer que le blocage sélectif de MIF peut ralentir le développement de la maladie, voire la faire régresser. Pour répondre à cette question clé, il nous faut avoir recours à des modèles animaux d'étude de l'HTAP. Ainsi l'utilisation d'un modèle rongeur sera nécessaire pour obtenir un modèle approprié permettant d'étudier *in vivo* et de façon intégrée la maladie humaine. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de réduire, remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier les relations entre le système immunitaire et le système cardiovasculaire uniquement par des systèmes *in vitro* ou *in silico*.

Dans notre projet, nous ferons donc appel au modèle monocrotaline, modèle établi d'hypertension pulmonaire pour valider et mieux comprendre les mécanismes impliqués décrits ci-dessus et voir si MIF peut être une nouvelle cible thérapeutique dans cette maladie sévère. Pour avoir un résultat statistiquement exploitable, nous avons prévu un effectif réduit au maximum à 192 rats. Pour s'assurer du bien-être animal, un score prenant en compte l'apparence, le poids et le comportement des animaux sera mis en place et ils seront logés dans un environnement contrôlé et bénéficieront d'un enrichissement adapté.

16392 Le succès à long terme des traitements anticancéreux dépend en grande partie de la capacité de rétablir l'immunosurveillance anticancéreuse. Des chimiothérapies telles que les anthracyclines ou l'oxaliplatine peuvent stimuler la mort cellulaire immunogène (DCI), qui convertit les cellules tumorales mourantes qui induisent une réponse immunitaire puissante, impliquant les lymphocytes T cytotoxiques contre les cellules tumorales résiduelles. Une caractéristique de la DCI est la production d'ATP via l'activation de l'autophagie.

Ce projet a pour but de caractériser *in vivo* une molécule capable d'induire la DCI *in vitro*. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences d'évaluation de processus impliqués dans la DCI (autophagie) et de croissance tumorale. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement.

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. Les contraintes pour les animaux seront essentiellement la greffe de cellules tumorales en sous-cutanées.

Ce projet, d'une durée maximale de 3 ans, impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes (n=350) et immunodéficientes (n=270). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous

envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail.

Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et de mettre en place des mesures en cas d'atteinte d'un point limite précoce. 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, les tailles et aspects des tumeurs seront particulièrement surveillées. 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.

16393 Ce projet a pour but d'étudier l'implication des cellules immunitaires au cours de la maladie Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Cette maladie neurodégénérative touche les neurones moteurs et entraîne une paralysie progressive et la mort des patients en moyenne 2 à 5 ans après le diagnostic sans qu'aucun traitement curatif n'existe à ce jour. Nous utilisons des modèles de souris de cette maladie pour étudier les mécanismes pouvant entraîner la mort des neurones dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et des biomarqueurs de la maladie. Quatre lignées de souris modélisant la SLA seront donc conservées pour ce projet qui utilisera 980 souris sur une durée de 5 ans. Tout au long de ce projet, nous nous assurerons de mettre en œuvre les règles de remplacement, réduction, et raffinement (3Rs). Concernant le remplacement, ces modèles sont actuellement les seuls qui permettent de reproduire la paralysie progressive chez l'adulte et donc de modéliser la physiopathologie humaine, raison pour laquelle notre projet nécessite l'utilisation de souris. Concernant la réduction, nous utiliserons le nombre d'animaux minimal nous permettant d'obtenir un résultat statistiquement significatif afin de pouvoir obtenir une conclusion scientifique à l'ensemble de nos travaux. Dans un souci de raffinement, toutes les précautions seront prises afin de n'imposer aucune souffrance ou une contrainte minimale aux souris utilisées et avons, pour chaque procédure, défini un point limite. De plus, un programme d'enrichissement sera suivi en ajoutant dans la cage les éléments suivants : « Mouse house » ou carrés de coton pour nids.

16394 L'étude de la relation entre les sécrétions des glandes endocrines et le vieillissement est toujours d'actualité. De nombreux chercheurs ont exploré les modifications des taux d'hormones liées à l'âge en tant que marqueurs biologiques et également en tant que mécanismes possibles du vieillissement. Un nouveau chapitre de la compréhension des relations entre hormones et vieillissement a été ouvert par la démonstration que les altérations génétiques de la signalisation hormonale chez le ver *Caenorhabditis elegans*, peuvent avoir un impact profond sur la longévité. Des travaux ultérieurs ont permis d'établir que la signalisation d'IGF1 (facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline) avait un impact sur la régulation de la durée de vie des souris. De plus, les caractéristiques phénotypiques des souris âgées incluent une incidence réduite et un début retardé du cancer, et un vieillissement immunitaire retardé. Les effets de facteurs ou de médicaments qui augmentent la durée de vie sur le développement spontané de tumeurs peuvent fournir des indices importants sur les interactions du vieillissement et de la carcinogenèse.

Nous avons sélectionné, *in vitro*, une molécule qui semble avoir un effet significatif sur le récepteur de l'IGF1 (IGF-1R).

Ce projet a pour but de caractériser *in vivo* les effets anti-cancer et anti-âge de cette molécule. Pour la réalisation de cette étude, nous évaluerons l'inhibition de l'IGF-1R (avec l'injection de la molécule en absence et en présence d'un régime gras) et ensuite nous effectuerons des expériences de croissance tumorale.

Ce projet a été conçu dans le respect des 3R.

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. Nous avons besoin de réaliser des expériences *in vivo* chez les souris afin de pouvoir confirmer nos données obtenues *in vitro*.

Réduction : Ce projet, d'une durée maximale de 3 ans, impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes (n=592) et immunodéficientes (n=240). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail (le nombre de souris sera ainsi diminué). 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.

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. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être (maximum 5 souris par cage). Concernant l'enrichissement du milieu, les animaux disposeront de coton dans les cages. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux sont examinés quotidiennement. 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.

16395 L'organisation mondiale de la Santé a inscrit les envenimations par les serpents sur sa liste prioritaire des pathologies tropicales négligées. En France, les morsures de serpents mettant en jeu le pronostic vital sont liées à l'élevage privé de serpents exotiques et aux espèces *Bothrops* endémiques en Guyane et Martinique. Les morsures de *Bothrops* provoquent des signes locaux (œdème, nécrose tissulaire) et des signes généraux tels que la consommation des facteurs de la coagulation rendant le sang incoagulable, l'hypovolémie par hémorragie spontanée et une dysfonction vasculaire d'origine endothéliale. Le seul traitement est l'administration d'antivenins bien que leur efficacité ait été récemment discutée. Le plus souvent, les antivenins sont administrés tard après la morsure alors que le processus toxique est déjà engagé. Ainsi, en dépit de la neutralisation des toxines circulantes, l'envenimation peut s'accompagner d'une réponse inflammatoire conduisant à un syndrome de défaillance multi-viscérale et au décès du patient. De plus, pour des raisons économiques, la commercialisation de l'unique antivenin disponible sur le marché est menacé. C'est pourquoi, en raison des risques prévisibles liés au retrait du marché de *Bothrofav2®*, nous souhaitons développer un modèle animal d'envenimation par *Bothrops lanceolatus*, avec pour objectifs 1- de caractériser les effets neuro-respiratoires et les effets sur l'hémostase (hémostase primaire, coagulation et fibrinolyse) du venin de *B. lanceolatus*, par une description de relations effets/doses et effets/concentrations; 2- de décrire les effets du venin de *B. lanceolatus* sur l'inflammation systémique et d'évaluer une possible toxicité mitochondriale et 3- d'évaluer l'efficacité d'un antivenin pour prévenir les effets de l'envenimation.

Bien que des études sur des préparations de tissus humains avec des venins de *Bothrops* soient en cours afin de valider les effets délétères de ces morsures sur différentes fonctions vitales, le développement d'un modèle animal est indispensable afin de mimer au mieux les atteintes multi-viscérales induites par ce venin. Par conséquent, ce projet a été élaboré afin de respecter le principe des 3R en remplaçant l'animal par des préparations de tissus humains exposés au venin comme indiqué précédemment, 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 le rat en raison des méthodes utilisées pour ce projet et des volumes sanguins nécessaires aux différentes analyses. Les animaux seront hébergés par 3 avec la mise en place dès leur arrivée d'enrichissement approprié (bâtons) afin d'améliorer leur bien-être général, réduire leur stress, éviter l'ennui et faciliter le contact humain. L'ensemble des gestes chirurgicaux, effectué par du personnel formé, s'effectuera

sous anesthésie générale associée une analgésie péri-opératoire appropriée. La surveillance sera quotidienne et des analgésiques sont prévus en cas de souffrance.

Ce projet d'une durée de 5 ans nécessitera 256 rats Sprague-Dawley.

Différentes procédures seront réalisées chez le rat afin de caractériser le modèle d'envenimation d'un point de vue fonctionnel (respiration, fonction cardiaque et activité cérébrale) suite à l'exposition intraveineuse du venin de *B. lancolatus* à différentes doses. De plus, des prélèvements sanguins seront réalisés à différents temps pour étudier la pharmacocinétique du venin ainsi que mesurer les paramètres biologiques de défaillance d'organe, déterminer le thromboélastogramme sanguin et des facteurs de coagulation et enfin les biomarqueurs inflammatoires et de toxicité mitochondriale.

Grace à ce projet expérimental, nous espérons pouvoir reproduire chez l'animal les caractéristiques de la réponse inflammatoire et l'atteinte toxique décrite chez les patients envenimés par les venins de *Bothrops* et ainsi définir de nouvelles cibles thérapeutiques et de proposer de nouveaux traitements en réponse à l'arrêt prochain de l'antivenin actuel.

16396 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 l'asthme, le diabète ou le VIH, les patients se procurent leur traitement à la pharmacie et le gèrent de manière autonome. 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, à l'hôpital, par perfusions intraveineuses. Ce mode de prise en charge est contraignant pour le patient et a aussi un coût important lié à la complexité du circuit.

Pour faire face à la forte augmentation annoncée du nombre de nouveaux cas de cancer, mais également pour diminuer significativement la charge financière importante des traitements anticancéreux, le développement de chimiothérapies, à la fois efficaces et peu coûteuses, représente un réel besoin clinique. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est de mettre au point une nouvelle approche pour la délivrance de tout type de principes actifs anticancéreux, qui soit à la fois efficace, confortable pour le patient et bien moins coûteuse dans son utilisation que les chimiothérapies actuelles. Pour y parvenir, l'idée est de concevoir des nanomédicaments chargés en principes actifs capables d'être administrés par voie sous-cutanée (SC). Nous pensons que la voie SC est supérieure à la voie orale, bien que cette dernière soit plus facile d'utilisation, car elle permet une biodisponibilité (quantité de principe actif qui se retrouve dans le sang) plus élevée et mieux contrôlée.

Pour cela, nous avons développé une nouvelle technologie brevetée de prodrogues polymères solubles qui permet d'améliorer l'absorption des molécules par voie SC.

Les études seront de 2 types : 1) des études d'innocuité permettant de vérifier que nos nanomédicaments n'ont pas d'effets toxiques au niveau du tissu sous-cutané ; 2) des études de pharmacocinétiques permettant d'évaluer la biodisponibilité du principe actif dans le sang après injection SC.

Ces études seront menées sur des souris. Le recours à l'animal est incontournable pour évaluer le devenir des nanomédicaments *in vivo* car durant leur transport dans l'organisme les médicaments vont interagir avec les éléments du système immunitaire et être soumis à une métabolisation, principalement hépatique, qui peut provoquer l'apparition de métabolites, pouvant être plus ou moins actifs voire toxiques. Il est donc indispensable, pour tenir compte de tous ces phénomènes, de réaliser ces études sur l'animal.

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 permettra aussi de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Pour la réalisation de ce projet, nous utiliserons 1020 souris sur 5 ans.

Les animaux seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi afin de favoriser leur bien-être. Les méthodes utilisées seront appropriées pour réduire le plus possible le stress que pourraient

ressentir les animaux. Des méthodes d'anesthésie seront utilisées le cas échéant pour exécuter toute intervention douloureuse.

16397 Le cerveau est protégé du sang par la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par la paroi imperméable des vaisseaux sanguins cérébraux. Cette BHE est essentielle pour le maintien d'un milieu compatible avec le bon fonctionnement des neurones en assurant une homéostasie cérébrale et en régulant de manière sélective par le biais de protéines de transports spécifiques, l'accès et la sortie du cerveau de molécules dont des médicaments. La mise en évidence de ces transporteurs de médicaments présents à la surface de la BHE n'est pas encore totalement élucidée.

Dans le cadre d'une meilleure compréhension des mécanismes d'accès au cerveau, il est essentiel de déterminer les mécanismes de passage moléculaire et notamment comprendre pourquoi certaines molécules sont capables de franchir la BHE et d'atteindre le cerveau et d'autres non, afin d'envisager et d'évaluer les différentes stratégies qui peuvent être mises en place pour permettre ou optimiser le passage d'un médicament dans le cerveau.

Différentes méthodes ont été mises au point pour prédire l'interaction de médicaments avec les transporteurs de la BHE par des méthodes informatiques (dites *in silico*) combinées avec des approches *in vitro*, utilisant notamment des cultures de cellules. Néanmoins, ces différentes approches, si elles représentent des outils extrêmement intéressants, ne permettent pas de recréer à ce jour la BHE telle qu'elle peut se présenter de manière physiologique, dans toute sa complexité. Il est donc nécessaire de pouvoir compléter les données en évaluant le passage au travers de la BHE et l'accès aux différentes zones du cerveau par des approches *in vivo*. Dans la mesure où la structure de la BHE est très similaire au sein des mammifères, les résultats obtenus chez le rongeur de laboratoire (rat et souris) peuvent, dans la grande majorité des cas être transposés à l'homme avec un bon niveau de prédictivité.

Un transporteur de médicament présent au niveau de la BHE responsable du transport de différents composés dont des psychotropes, a fait l'objet d'une étude *in silico* qui nous permet de prédire les composés qui peuvent interagir avec ce transporteur. Notre objectif est de pouvoir évaluer *in vivo* certaines de ces prédictions.

Ainsi, des molécules préalablement identifiées positivement comme substrat par les tests *in silico* et cellulaire seront évaluées chez la souris afin de pouvoir valider leurs propriétés d'interactions avec les transporteurs présents à la BHE *in vivo*. Le principe de la technique utilisée est d'isoler le cerveau de la circulation cardiaque pendant 2 minutes par la perfusion d'un fluide de composition contrôlée par l'expérimentateur à l'aide d'un cathéter inséré dans l'artère carotide commune. L'ensemble de la procédure est réalisé sous anesthésie générale de l'animal. Cette technique sensible et spécifique et permet d'étudier les mécanismes de transport des molécules à travers la BHE.

Ceci permettra l'étude de l'impact de la BHE et des transporteurs sur ces candidats thérapeutiques et favorisera le développement de nouvelles molécules capables de franchir la BHE.

La durée estimée du projet est de 5 ans.

Le nombre d'animaux estimé pour la réalisation de ce projet est de 800 souris. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. La souffrance et l'angoisse infligées aux animaux seront limitées au maximum, une surveillance sera mise en place et des points limites adaptés ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

16398 Depuis quelques années, les cliniciens ont observé que les patients ayant reçu des anesthésiques locaux en complément de l'anesthésie générale lors de leur opération chirurgicale pour cancer avaient une meilleure survie. De façon intéressante, il a été montré que les produits d'anesthésie locale pouvaient induire la mort de cellules cardiaques ou nerveuses. Des premiers travaux *in vitro* laissent supposer que ces produits pourraient induire également la mort des cellules cancéreuses. L'objectif de ce projet est de déterminer si ces produits induisent également la mort des cellules cancéreuses dans un organisme vivant (= *in vivo*). En effet, dans un modèle vivant, les médicaments subissent une transformation chimique et biologique qui peuvent modifier leurs propriétés et invalider les effets observés *in vitro*. Par ailleurs, il est également bien connu que les produits d'analgésie interfèrent avec

le métabolisme et le système immunitaire. Or, les produits d'anesthésie locale possèdent une propriété analgésique. Les effets attendus *in vivo* pourraient être différents de ceux observés précédemment sur des cellules en culture. Par contre, la confirmation *in vivo* d'une induction de mort des cellules cancéreuses apporterait la possibilité d'associer de manière systématique les agents d'anesthésie locale à la chirurgie oncologique et améliorer la survie des patients.

Dans ce projet, l'ensemble des expériences a été conçue afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable afin de prouver que les réactions subies par les agents d'anesthésie locale au sein d'un organisme n'altèrent pas leur capacité à induire une réponse anti-tumorale. Seul le nombre minimal de souris, calculé mathématiquement, sera utilisé dans l'étude. Le nombre d'animaux par groupe sera de 10 et les expériences seront effectuées trois fois au maximum pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Les animaux seront observés quotidiennement afin de vérifier leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict (avec échelle d'évaluation relevant des signes cliniques que: perte de poids, pelade, agressivité, prostration, agitation, petits yeux, oreilles en arrière...) permettra d'apporter des soins appropriés. Des mesures seront prises pour limiter au maximum le stress et la douleur au cours des expériences. 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 aussi une lecture régulière des expériences publiées sur le sujet afin d'éviter de reproduire une expérience déjà rapportée dans la littérature. Les contraintes pour les animaux seront celles de greffes de tumeurs en sous-cutanée. Le nombre d'animaux maximal prévu pour ce projet est de 600.

16399 L'hémophilie A est une maladie hémorragique rare affectant principalement les hommes (1 naissance de garçons sur 5000 environ). Il s'agit d'une maladie génétique et le gène affecté est celui du facteur VIII, une protéine clé de la cascade de la coagulation. Il existe plusieurs types d'hémophilie A (mineure, modérée et sévère) en fonction du taux résiduel du facteur VIII circulant. L'hémophilie A sévère est due à une absence totale de facteur VIII et si la maladie n'est pas traitée, l'espérance de vie est en moyenne de 15 ans. Le traitement standard de l'hémophilie A repose sur l'injection intra-veineuse régulière (2-3 fois/semaine) de facteur VIII soit recombinant, soit purifié à partir de plasma. Ce traitement est lourd et coûteux. Récemment un anticorps thérapeutique qui peut se substituer au facteur VIII a été développé. Cet anticorps (émicizumab) a montré une très bonne efficacité chez les patients hémophiles A sévères et est désormais approuvé par les autorités de santé. Il est administrable par voie sous-cutanée 1-2 fois/mois. L'émicizumab ne normalise pas la coagulation mais transforme une hémophilie sévère en hémophilie mineure. De ce fait, un traitement par émicizumab n'est pas toujours suffisant et doit parfois être utilisé en combinaison avec d'autres agents procoagulants. L'effet de telles associations est encore très mal connu et lors des essais cliniques sur l'émicizumab, il y a eu malheureusement des accidents pro-thrombotiques et des cas de décès de patients dû à un emballement du système de coagulation. Une seconde question concerne l'utilisation de l'émicizumab chez des patients hémophiles mineurs. En effet, on ignore si l'émicizumab peut agir en synergie avec le facteur VIII.

Le but de notre projet est donc d'étudier l'effet des associations entre émicizumab et autres agents thérapeutiques procoagulants dans un modèle murin d'hémophilie A.

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 le mode d'action de l'émicizumab, il est crucial de pouvoir tester son effet dans un modèle animal d'hémophilie A.

Nous prévoyons d'utiliser 180 souris pour ce projet. Des groupes de 8 à 10 souris sont prévus afin d'assurer une réponse statistiquement analysable.

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 seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux.

16400 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 72 animaux pour l'ensemble des procédures.

16401 Le diabète représente une véritable épidémie avec plus de 425 millions de personnes atteintes dans le monde. L'augmentation des facteurs de risque (obésité, surpoids, sédentarité, mauvaise alimentation) laisse présager une augmentation de la prévalence du diabète dans les années à venir. La neuropathie diabétique (ND) est la complication chronique la plus fréquente du diabète. Elle concerne les atteintes du système nerveux périphérique, c'est-à-dire les nerfs sensitifs et moteurs ainsi que les nerfs du système nerveux autonome qui commandent nos organes. La ND perturbe considérablement la sensibilité à la douleur et au toucher. Chez certains patients, elle provoque des douleurs terribles reflétant une atteinte des neurones véhiculant les informations douloureuses. A plus long terme, la dégénérescence de ces neurones peut rendre indolore une simple blessure au pied qui peut facilement s'infecter et mener à une gangrène puis à l'amputation. Ces complications au niveau du pied ont une incidence économique et sociale très importante, avec un risque d'amputation multiplié par 10 à 15 chez les patients diabétiques. Actuellement, les thérapies utilisées pour le traitement des ND sont d'une part de rééquilibrer la glycémie (non efficace dans le cas du diabète de type 2) et d'autre part d'utiliser des molécules antidouleurs.

De nombreuses études se sont consacrées à l'impact de l'hyperglycémie dans le développement de la neuropathie mais très peu se sont intéressées au rôle de la dérégulation lipidique et plus précisément du LDL (Low Density Lipoprotein) cholestérol dans la mise en place de la pathologie.

Les objectifs de cette étude sont: 1) De développer une nouvelle lignée de souris mutante présentant une perturbation de la concentration de LDL (Low Density Lipoprotein) cholestérol plasmatique. 2) D'étudier l'impact d'une dérégulation du métabolisme du LDL cholestérol sur le développement de la neuropathie. Nous évaluerons la neuropathie en réalisant des tests sensoriels et moteurs. L'utilisation de modèles murins de ND est couramment utilisée en recherche et présente l'avantage de mimer les déficits sensoriels (perte de sensibilité tactile et douloureuse) et morphologiques (diminution de l'innervation au niveau de la peau) observés chez les patients. Ce projet nous permettra de mieux comprendre le rôle de la dérégulation du métabolisme du LDL-cholestérol dans le développement et la progression de la ND. Il pourrait permettre à plus long terme le développement de nouvelles thérapies afin de prévenir ou freiner le développement de la pathologie.

Pour cette étude, nous utiliserons un maximum de 75 souris.

Nous serons particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux vivants est indispensable car la ND est impossible à reproduire sur des modèles *in vitro* simplifiés. Le modèle de ND est couramment utilisé chez la souris car elle permet de reproduire les déficits observés chez l'homme. Les études seront systématiquement optimisées d'après la littérature et/ou les observations réalisées au laboratoire.

Réduction : L'utilisation des animaux sera réduite au maximum et les expériences seront planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter des pertes inutiles. L'application de cette politique de réduction mise en place permettra d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer un maximum d'information d'un minimum d'animal.

Raffinement : Les protocoles sont réfléchis afin de réduire la douleur et la détresse de l'animal. Pour les manipulations pouvant entraîner trop de stress, les souris seront maintenues anesthésiées sous isoflurane à 1.5% sur un plateau chauffant afin d'avoir un état d'inconscience de qualité tout le long des manipulations et de prévenir toute hypothermie. Les animaux seront sous la surveillance de personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir-faire permettra de réaliser nos expérimentations dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Tous les animaux sont hébergés dans un service de zootechnie ayant un environnement enrichi qui a été agréé par le ministère.

- 16402** Les infections par le protozoaire *Cryptosporidium parvum* ont une très forte prévalence à travers le monde, conduisent à des pertes économiques importantes chez les ruminants et affectent aussi la santé humaine. Ce parasite se développe dans les cellules intestinales des animaux et provoque des diarrhées pouvant conduire dans certains cas à la mort. Devant l'absence de vaccin (en santé humaine ou vétérinaire) et de traitement totalement efficace, il est nécessaire de rechercher de nouveaux moyens de contrôle. L'établissement de la transgénèse, technique permettant la modification du génome, chez *C. parvum*, est un prérequis pour le développement de souches parasitaires avirulentes et pour la validation de nouvelles cibles thérapeutiques. Les essais de modification génétique par transfection chez *C. parvum* se sont longtemps révélés infructueux mais une équipe américaine est enfin parvenue à valider une technique de transgénèse pour ce parasite en 2015. Cette méthode requiert une étape de sélection *in vivo* (en modèle murin) juste après la transfection pour permettre aux parasites recombinants d'effectuer la fin de leur cycle de développement. De plus, seul le stade parasitaire 'sporozoite' peut être transfecté par cette technique. Or, les sporozoites libres sont fragiles et ne peuvent pas être inoculés par voie orale, ce qui impose de réinjecter ces parasites transfectés directement dans l'intestin de souris immunodéficientes à l'aide d'une technique simple de chirurgie. Ce projet a pour objectifs de (i) valider la méthode d'inoculation des parasites transfectés par chirurgie abdominale à l'aide de vétérinaires référents, (ii) de former le personnel de l'équipe amené à réaliser ces expérimentations et de permettre la construction de souches parasitaires de *C. parvum*

recombinantes dans le cadre d'un projet de recherche déjà financé, (iii) de maintenir ces souches parasitaires générées par multiplication *in vivo*. Ce programme de recherche permettra de générer des souches recombinantes pour de multiples applications (vaccination, recherche de facteurs de virulence, impact de la réponse immunitaire adaptative, suivi du parasite dans les tissus infectés).

Le projet est demandé pour une période de 3 ans. La validation de la méthode sera facilitée par la visite d'une chercheuse de l'équipe dans le laboratoire ayant mis au point la technologie en Janvier 2017 pour suivre la mise en œuvre complète d'une expérimentation (de la transfection à la ré-inoculation aux souris). Vingt souris immunodéficientes (IFN γ -/-) seront utilisées par an pour la chirurgie (soit 60 souris), ainsi que 240 souris au total pour la multiplication des souches générées, soit 300 souris au total sur les 3 ans du projet.

Remplacement : la chirurgie pour inoculer les sporozoïtes est indispensable pour conserver ces formes fragiles qui ne survivraient pas au passage dans l'estomac après une inoculation par voie orale. Tous les essais d'alternatives à la chirurgie testés dans le laboratoire américain sont restés infructueux (inoculation par voie orale ou rectale, inoculation sur la membrane d'œufs embryonnés, etc.).

Réduction : Le fait que toutes les étapes de la technique aient été préalablement mises au point et optimisées dans un laboratoire américain nous aidera à utiliser le nombre minimal d'animaux pour sa mise en place au sein de notre établissement, d'autant que l'un de nos chercheurs a fait un séjour dans ce laboratoire américain en janvier 2017 pour apprendre et suivre la procédure dans son intégralité.

Raffinement : Les souris seront groupées par nombre de 4 par cage avant et après chirurgie avec un enrichissement du milieu (feuilles de sopalin dans les cages). Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale suivie d'un traitement analgésique approprié à la technique et à l'espèce.

16403 Le cancer du côlon est la deuxième cause de décès par cancer en France et dans le monde. Le cancer du côlon est causé par la transformation maligne de cellules de l'épithélium intestinal, qui sépare la muqueuse et les riches communautés microbiennes qui vivent dans la lumière du colon (le microbiote intestinal). L'inflammation intestinale change la composition du microbiote et contribue au développement du cancer du côlon, mais les mécanismes restent mal compris.

Les MAITs (Mucosal Associated Invariant T cells) sont des lymphocytes T abondants et présents chez la souris et l'humain. Ils sont situés dans les tissus muqueux comme l'intestin et reconnaissent des dérivés de la vitamine B2 produits par les bactéries de la flore intestinale. Leurs fonctions varient selon le contexte: les lymphocytes MAIT peuvent tuer des cellules cibles, mais aussi favoriser la croissance tumorale. Chez les patients atteints de cancer du côlon, la flore intestinale change, et les bactéries qui produisent la vitamine B2 deviennent plus abondantes. D'autre part, les lymphocytes MAITs sont activés et migrent dans l'intestin. Une fréquence élevée de lymphocytes MAITs dans le cancer du côlon est corrélée à une survie plus courte, mais on ne sait pas si la fréquence élevée de MAITs est la cause ou la conséquence du cancer du côlon.

L'objectif de ce projet est de définir le rôle (pro- ou anti-tumoral) des lymphocytes MAITs dans le cancer du côlon. L'étude permettra d'envisager de nouveaux traitements ciblant les lymphocytes MAITs pour les activer ou les inhiber, selon le résultat de l'étude.

Ce projet nécessitera un total de 52 souris sur 5 ans. Ce nombre a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats. Ce projet améliorera notre compréhension des relations entre le système immunitaire, le microbiote et le cancer du côlon, et peut offrir de nouvelles opportunités thérapeutiques.

Remplacer : Les données obtenues chez l'humain ont permis d'identifier une corrélation entre la fréquence de lymphocytes MAITs et la progression tumorale, mais ne permettent pas de savoir quel rôle jouent les lymphocytes MAITs dans cette pathologie. Le modèle animal est donc nécessaire à ce stade pour définir si les MAITs jouent un rôle bénéfique (anti-tumoral) ou néfaste (pro-tumoral) dans le cancer du côlon.

Réduire : nous utiliserons un modèle de cancer du côlon induit par l'inflammation chez la souris. Le modèle a déjà été mis en place et présente une pénétrance de 100% (toutes les souris incluses dans

le protocole développent une tumeur et peuvent donc être étudiées), limitant ainsi le nombre d'animaux à utiliser.

Raffinement : En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux. L'inflammation intestinale et le développement de tumeurs sont induits par administration de produits chimiques (sel de sulfate de dextran et azoxymethane), et peuvent causer des diarrhées. En cas de déshydratation, les souris seront réhydratées par voie intrapéritonéale. Le protocole induira des tumeurs du côlon chez des souris sauvages ou déficientes en lymphocytes MAITs, ce qui permettra de formellement définir le rôle de ces lymphocytes dans ce modèle de cancer du côlon.

Une grille de score adaptée a été mise en place.

16404 Les myopathies centronucléaires sont un groupe de maladies génétiques humaines rares touchant le muscle, liées à des mutations dans différents gènes, ayant en commun des lésions morphologiques du muscle typique, une faiblesse et une hypotrophie musculaires, ainsi qu'une altération du couplage excitation-contraction. Parmi les gènes en cause, le gène HACD1, identifié comme étant à l'origine d'une myopathie centronucléaire chez le chien Labrador, n'a longtemps été relié à aucune maladie génétique chez l'Homme. Cependant, l'identification de ce gène chez le chien, grâce à l'établissement d'une colonie de chiens atteints par cette maladie, a à la fois permis de progressivement éliminer la maladie des pedigrees de Labradors, et d'identifier la mutation en cause dans trois familles atteintes de myopathie congénitale chez l'Homme. Récemment, de nombreuses pistes thérapeutiques ont été identifiées pour les myopathies centronucléaires dans des modèles cellulaires, puis validés *in vivo* dans des modèles murins, et sont, pour beaucoup, aux portes des essais cliniques. Les chiens atteints par cette myopathie centronucléaire liée à HACD1, qui reproduisent fidèlement les principaux éléments du tableau clinique et histopathologique de ce groupe de maladies humaines, sont un modèle d'intérêt pour évaluer l'efficacité de ces candidats médicaments de thérapie génique ou pharmacologique, validés au préalable *in vitro* et chez la souris. En prévision de ces essais précliniques, et afin de pouvoir les construire au mieux, tout en limitant le nombre de chiens à inclure au minimum nécessaire, il est impératif de connaître la variabilité de la maladie chez ces chiens, quantifiée au moyen de méthodes d'évaluation adaptées, et non-invasives. C'est l'objectif de ce projet qui comporte 20 animaux. Dix chiens malades et dix chiens témoins frères/sœurs de portée seront inclus. Cet effectif permettra, en limitant le nombre d'individus, d'apprécier la variabilité du phénotype. Ces données, obtenues sur des chiens non traités, pourront également être utiles pour comparer de futurs chiens traités. Les chiens seront suivis durant leurs deux premières années, au moyen de méthodes d'évaluation, pour la plupart également utilisés en clinique chez les patients atteints de ces maladies. Les chiens témoins seront mis à l'adoption à l'issue de ces deux ans. Cette myopathie, bien que modérée, sera prise en charge par un suivi vétérinaire étroit, permettant d'anticiper et d'éviter toute souffrance potentielle. Les chiens seront hébergés en petits groupes d'animaux, auront des jouets divers à leur disposition, un lieu de couchage, une plateforme, et bénéficieront d'une sortie quotidienne en groupes avec jouets et pataugeoires.

16405 On estime, en 2018, à plus de 43 000 le nombre de nouveaux cas de cancer colorectal en France. Il s'agit du troisième cancer le plus fréquent et du deuxième cancer en termes de mortalité, avec plus de 17 000 décès par an en 2018. Le diagnostic précoce de ces cancers est un enjeu majeur afin d'établir un traitement le plus tôt possible et par conséquent avoir un impact direct sur la survie du patient. Même s'il existe des tests biologiques de plus en plus performants, l'imagerie médicale, si elle est optimisée, reste un outil performant et quasi non invasif pour la détection précoce de ces cancers. Elle permet également la validation de molécules thérapeutiques qui peuvent cibler directement ces cancers. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à 2 récepteurs : le Gastrin Releasing Peptide Receptor (GRPr) et le Neurotensine 1 (NTS 1) qui sont exprimés au niveau du cancer du côlon HT 29. Aujourd'hui, il n'existe pas de médicament radiopharmaceutique ciblant le récepteur GRPr ou NTS1 utilisé en routine. Ces récepteurs sont naturellement ciblés par deux molécules (peptides) qui sont la Bombésine pour GRP-r et la neurotensine pour NTS1. Notre partenaire a mis au point et validé *in vitro* deux peptides

(hétérodimères) radiomarqués au ⁶⁸Ga qui ciblent ces deux récepteurs. Nous proposons ici une approche bimodale permettant de cibler en une seule injection les tumeurs sur-exprimant GRP-R et NTS1. Les résultats *in vitro* ne peuvent suffire pour valider le ciblage de tumeurs de nos molécules car il faut pouvoir confirmer nos résultats sur un modèle *in vivo*.

Ces deux hétérodimères sont facilement radiomarquables au Gallium-68, isotope utilisé pour l'imagerie TEP Tomographie par émission de positons). Nous pouvons ainsi évaluer la biodistribution des molécules *in vivo* et faire également le suivi du traitement des tumeurs.

L'étude sera menée sur un modèle de souris présentant des xénogreffes de tumeurs de colon humaines (HT 29). Les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible pour pouvoir évaluer la biodistribution d'une molécule et avoir un nombre d'animaux suffisant pour une approche statistique solide. 5 souris est le nombre minimum d'animaux nécessaire par condition pour cette évaluation. Il y aura 4 lots de 5 souris pour chaque radioligand : 1 lot pour tester l'affinité d'un hétérodimère sur les deux récepteurs cibles des tumeurs, un lot pour évaluer l'affinité sur le récepteur GRP-r en bloquant le récepteur NTS-1 par injection de neurotensine « froide », un lot pour évaluer l'affinité sur le récepteur NTS-1 en bloquant le récepteur GRP-r par injection de bombésine « froide » et enfin un lot « contrôle positif » en bloquant les deux récepteurs par injection de bombésine et de neurotensine pour visualiser les liaisons non spécifiques sur la tumeur des deux hétérodimères. Au total, 40 animaux seront utilisés dans ce projet. Les souris sont placées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les animaux sont nourris ad libitum et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale sous isoflurane 2%. Nous avons choisi des points limites clés qui permettent de prévenir une détérioration de l'état clinique général de l'animal dans le but d'éviter une quelconque souffrance. Les points limites sélectionnés sont les suivants : perte de poids supérieure à 20%, déshydratation, immobilité de plus de 1h (signe d'une douleur aigue) et ulcération de la tumeur ainsi que la limitation de la taille de la tumeur.

16406 La maîtrise des cycles sexuels dans les élevages de mammifères domestiques, particulièrement les ovins, porcins, caprins et bovins, est indispensable pour permettre un étalement annuel de la production du lait et de la viande et pour pratiquer l'insémination artificielle. Les traitements hormonaux utilisés pour la maîtrise de la reproduction miment un cycle sexuel et permettent la synchronisation et l'induction de l'œstrus (chaleurs) et de l'ovulation. Bien que ces pratiques zootechniques soient largement utilisées, un certain nombre de problèmes (tel que la réponse immunitaire aux gonadotropines injectées) restent récurrents et conduisent à de mauvais résultats de fertilité chez les femelles traitées et inséminées. L'utilisation de ces hormones, extraites de tissus animaux, présente également un risque sanitaire potentiel pour les animaux d'élevages et, par conséquent, pour la qualité des produits dédiés à la consommation (lait, viande, produits laitiers). C'est dans ce contexte et pour pallier à ces inconvénients que nous développons une méthode alternative aux traitements d'induction de l'ovulation ne présentant pas les défauts décrits ci-dessus. Les molécules que nous avons développées ont été sélectionnées grâce à des essais *in vitro* réalisés sur des lignées cellulaires spécifiques. Cependant, les essais *in vitro* ne permettent pas de prédire l'effet de molécules sur la fonction de reproduction *in vivo*.

Nous souhaitons donc tester *in vivo* les molécules que nous aurons sélectionnées *in vitro*, afin d'évaluer si leurs effets observés *in vitro* s'observent également chez l'animal entier. Pour cela, deux bio-essais de la pharmacopée seront utilisés. L'expérimentation sera réalisée sur des rats Wistar de 21 jours.

REPLACEMENT : La fonction de reproduction chez les mammifères est le résultat d'une communication hormonale étroite et complexe entre l'hypothalamus, l'hypophyse, et les gonades. Les modèles *in vitro* ne peuvent refléter une telle complexité. Les propriétés pharmacocinétiques des molécules sont des paramètres qui vont également interférer sur l'effet final et qui ne sont pas mesurables *in vitro*.

REDUCTION : Le nombre total d'animaux a été calculé en fonction du nombre de molécules à tester que nous estimons pouvoir obtenir au cours de cette année. Deux types de protocoles seront réalisés : une chez le rat mâle et une chez la femelle. Sept cent cinquante (750) mâles et mille quatre cent cinquante (1450) femelles seront utilisés au maximum. Le nombre d'animaux par lot a été déterminé

grâce à des résultats préliminaires, de manière à obtenir une puissance de test entre 70% et 90% 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 et de jouets. En cas d'isolement ou de prostration, l'expérimentation sur cet animal sera immédiatement interrompue et l'animal sera euthanasié.

16407 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. Le stress chronique est un facteur déterminant dans son apparition. Malheureusement, la physiopathologie de la dépression est mal connue. Nous faisons, ici, l'hypothèse que des modifications de la neuroplasticité du cortex cingulaire antérieur (CCA), sous-tendent la dépression induite par le stress. Nous proposons une étude comportementale et génomique pour étudier les rôles des neurones glutamatergique et GABAergique du CCA dans la dépression induite par le stress avec au préalable une étude nous permettant de choisir le modèle de stress le plus pertinent parmi trois modèles couramment utilisés en recherche préclinique. Le projet nécessitera 420 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, 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.

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 induit par le stress seront constitués de 40 souris (nous réaliserons 2x les expériences, soit 2x 20 animaux par groupe, afin de vérifier la reproductibilité des résultats et de s'assurer que les résultats finaux ne soient pas issus d'un artefact) et ceux explorant les composantes moléculaires de 30 animaux. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés certaines des 7 procédures expérimentales détaillées ci-après feront partie d'un enchaînement et utiliseront les mêmes animaux, ce qui en réduira grandement l'effectif.

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.

16408 L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque cardiovasculaire qui se caractérise sur le plan métabolique par une augmentation plasmatique d'homocystéine, un acide aminé fortement toxique s'il n'est pas métabolisé. Le métabolisme de l'homocystéine est principalement effectué par une protéine, la cystathionine beta synthase (CBS). Les patients présentant une hyperhomocystéinémie à cause d'un déficit de cette protéine présentent non seulement des troubles cardiovasculaires mais également des

anomalies neurologiques. L'hyperhomocystéinémie est également fortement retrouvée chez les patients diabétiques. Abaisser le taux d'homocystéine sanguin devrait offrir des avantages préventifs ou thérapeutiques. Toutefois, tous les patients souffrants d'hyperhomocystéinémie ne répondent pas aux traitements médicamenteux actuellement sur le marché. Par conséquent, il est nécessaire de développer des traitements efficaces pour réduire les taux élevés d'homocystéine plasmatique. L'objectif de ce projet de recherche est de tester une nouvelle molécule, le PIF (préimplantation factor) qui est un peptide naturel, comme traitement visant à faire diminuer le taux d'homocystéine avec comme conséquence l'amélioration des défauts cardiovasculaires et neurologiques. Ses effets bénéfiques ont déjà été démontrés au niveau de l'inflammation neuronale et dans le cas du diabète de type 1. L'utilisation du PIF a été approuvée et est actuellement en phase de recherche clinique dans le traitement d'un type d'hépatite, ce qui montre que la molécule n'est pas toxique. Pour notre étude, nous utiliserons une lignée de souris au stade adulte présentant une hyperhomocystéinémie, c'est-à-dire qui portent une mutation sur le gène de la CBS, comparée à son témoin afin de démontrer une amélioration des fonctions neuronales et cardiovasculaires par des tests comportementaux et des tests biochimiques. Notre projet est un travail de physiologie intégrée à la base d'un développement de recherche clinique et aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire cette situation. En effet, il n'est pas possible de créer *in vitro* la complexité d'un organisme dans son ensemble avec les différents types cellulaires impliqués.

Cette étude nécessitera 80 souris au total : 4 groupes (traités et non traités pour chaque génotype) de 20 souris (10 mâles et 10 femelles) car l'étude statistique utilisée pour chaque expérience nécessite 10 souris et deux séries de prélèvements seront nécessaires afin d'effectuer tous les tests. L'administration de la molécule se fera en sous-cutanée. De plus, les différentes expérimentations pourront être effectuées sur des mêmes groupes de souris dans la mesure où celles-ci se révèlent non invasives, non douloureuses et non stressantes pour l'animal, comme les tests de comportements. Une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R :

« Réduire » le nombre d'animaux, ce nombre ayant été calculé après avoir établi l'ensemble des procédures expérimentales à l'aide d'un test de puissance statistique en se basant sur la variabilité entre animaux.

« Remplacer », pour atteindre les objectifs du projet basés sur une étude pré-clinique, un modèle intégré est nécessaire, n'ayant pas la possibilité de créer *in vitro* la complexité d'un organisme avec tous les différents types cellulaires impliqués.

« Raffiner » les approches expérimentales par une surveillance de façon journalière afin de vérifier tout comportement anormal traduisant une souffrance, comme des signes de prostration ou d'agressivité, et s'il n'y a pas de perte de poids au-delà de 15%. Afin de garantir le bien-être des animaux, le milieu sera amélioré par l'ajout d'un nid végétal et d'un rouleau en carton.

16409 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. Ces derniers peuvent engendrer, au cours de la maladie, l'apparition de dommages axonaux irréversibles (constituant la composante neurodégénérative de la maladie). 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 d'handicap moteur du jeune adulte. La prise en charge de la maladie consiste en des traitements des phases de poussée (par 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 ce jour aucun traitement médicamenteux permettant de guérir la SEP.

L'objectif principal de ce projet est de caractériser le rôle des astrocytes dans la SEP et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et de pouvoir ainsi proposer de 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 :

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. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale. Par conséquent, nous induirons une EAE à des souris mâles âgées de 2-3 mois de souche Aldh111: L10a (fond génétique c57bl6). Puis, nous suivrons l'évolution de la pathologie (grâce à un score clinique). Les souris seront mises à mort à plusieurs stades de la pathologie pour pouvoir par la suite réaliser des études transcriptomiques et protéomiques. 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'EAE permet d'appliquer au quotidien le raffinement des conditions de manipulation de ces animaux. De plus, le nombre d'animaux a été réduit au regard de nos données antérieures et de la littérature disponible sur les modèles animaux utilisés.

En prenant en compte ces recommandations, un total de 240 souris sera utilisé lors de ce projet.

16410 L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque cardiovasculaire. Les patients présentant une hyperhomocystéinémie présentent non seulement des troubles cardiovasculaires mais également des anomalies neurologiques et des atteintes du foie. L'objectif du projet est de déchiffrer les perturbations hépatiques reliées à l'hyperhomocystéinémie. Le foie est un organe central du métabolisme et de nombreuses maladies métaboliques ont leur origine au niveau hépatique bien que les manifestations cliniques soient extra-hépatiques. Par conséquent, de nombreuses maladies peuvent être traitées efficacement en ciblant le foie par des approches de transfert de gènes. Nous allons analyser l'effet de la correction d'expression hépatique d'une enzyme impliquée dans le métabolisme des lipides par un virus adéno-associé (AAV), un virus non pathogène et très attractif pour servir de vecteur de transfert de gènes, sur le phénotype d'hyperhomocystéinémie délétère au niveau du foie et des vaisseaux. Pour cela, nous utiliserons une lignée de souris au stade adulte présentant une hyperhomocystéinémie comparée à son témoin afin de démontrer une amélioration des fonctions hépatiques et cardiovasculaires par des tests comportementaux et des tests biochimiques. Notre projet est un travail de physiologie intégrée et aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire cette situation. En effet, il n'est pas possible de créer *in vitro* la complexité d'un organisme dans son ensemble avec les différents types cellulaires impliqués.

Cette étude nécessitera 80 souris au total : 4 groupes (traité et non traité pour chaque génotype) de 20 souris (10 mâles et 10 femelles) car l'étude statistique utilisée pour chaque expérience nécessite 10 souris et deux séries de prélèvements seront nécessaires afin d'effectuer tous les tests. L'administration du virus se fera en intraveineux sous anesthésie générale. De plus, les différentes expérimentations pourront être effectuées sur des mêmes groupes de souris dans la mesure où celles-ci se révèlent non invasives, non douloureuses et non stressantes pour l'animal, comme les tests de comportements.

Une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R :

« Réduire » le nombre d'animaux, ce nombre ayant été calculé après avoir établi l'ensemble des procédures expérimentales à l'aide d'un test de puissance statistique en se basant sur la variabilité entre animaux.

« Remplacer », pour atteindre les objectifs du projet basés sur une étude physiologique, un modèle intégré est nécessaire, n'ayant pas la possibilité de créer *in vitro* la complexité d'un organisme avec tous les différents types cellulaires impliqués.

« Raffiner » les approches expérimentales par une surveillance de façon journalière afin de vérifier tout comportement anormal traduisant une souffrance, comme des signes de prostration ou d'agressivité, et s'il n'y a pas de perte de poids au-delà de 15%. Afin de garantir le bien-être des animaux, le milieu sera amélioré par l'ajout d'un nid végétal et d'un rouleau en carton.

16411 La trisomie 21 est le syndrome génétique le plus fréquent dans la population générale. En raison des différentes politiques de dépistage, sa prévalence a été réduite de 1 sur 700 à 1 sur 2000 dans les pays industrialisés, suite au recours à l'interruption médicale de la grossesse. Ce projet s'inscrit dans la recherche d'un traitement visant à diminuer le retard des acquisitions chez ces patients. Ce retard des acquisitions serait dû à une diminution du nombre de neurones cérébraux en périodes prénatale et périnatale. Agir sur le nombre de neurones pourrait donc permettre de diminuer le risque de déficience intellectuelle dans cette pathologie et de changer son pronostic. Le but est de trouver un traitement permettant de protéger les neurones en période postnatale lorsque la découverte de la maladie est réalisée après la naissance, ou de protéger le cerveau en période prénatale lorsque les parents décident de poursuivre la grossesse. L'objectif de ce travail est de tester en période prénatale et postnatale l'injection sous-cutanée du PIF (facteur Préimplantatoire), un peptide d'origine embryonnaire et présentant des effets neuroprotecteurs, sur le nombre de neurones et les capacités comportementales de souriceaux et de souris adultes chez un modèle murin de la trisomie 21. Pour cela, nous tirerons parti du meilleur modèle de souris avec Trisomie 21 et du PIF produit synthétiquement (sPIF) et déjà testé dans des modèles rigoureux de toxicologie et de toxicocinétique. Notre projet est un travail de physiologie intégrée à la base d'un développement de recherche clinique et aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire cette situation. En effet, il n'est pas possible de créer *in vitro* la complexité d'un organisme dans son ensemble avec les différents types cellulaires impliqués.

Cette étude nécessitera 220 souris au total pour répondre à deux questions :

1. Quel est l'effet prénatal du PIF sur le cerveau de souris?

En raison des effets neuroprotecteurs du PIF démontrés pendant la grossesse et chez le nouveau-né, nous souhaitons tester le peptide au stade prénatal et périnatale dans un modèle préclinique, par la réalisation de tests fonctionnels et de tests de phénotypages à 10 jours, 30 jours et 90 jours après la naissance. 20 femelles seront nécessaires pour le traitement prénatal/périnatal afin de produire assez de souriceaux pour l'ensemble des expériences. Chaque traitement et expérience nécessitera quatre groupes de souris, témoins et trisomiques traitées et non traitées. Cette première partie nécessitera 140 souris.

2. Quels sont les effets postnataux du PIF sur le cerveau des souris?

En raison des effets neuroprotecteurs du PIF démontrés également chez l'adulte, nous souhaitons également effectuer un traitement entre 60 et 90 jours avec des tests fonctionnels et des tests de phénotypages à 70 jours et 90 jours afin de déterminer la meilleure période de traitement. Chaque traitement et expérience nécessitera quatre groupes de souris, témoins et trisomiques traitées et non traitées. Cette seconde partie nécessitera 80 souris.

L'administration de la molécule se fera en sous-cutanée. De plus, les différentes expérimentations pourront être effectuées sur des mêmes groupes de souris dans la mesure où celles-ci se révèlent non invasives, non douloureuses et non stressantes pour l'animal, comme les tests de comportements.

Une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R :

« Réduire » le nombre d'animaux, ce nombre ayant été calculé après avoir établi l'ensemble des procédures expérimentales à l'aide d'un test de puissance statistique en se basant sur la variabilité entre animaux.

« Remplacer », pour atteindre les objectifs du projet basés sur une étude pré-clinique, un modèle intégré est nécessaire, n'ayant pas la possibilité de créer *in vitro* la complexité d'un organisme avec tous les différents types cellulaires impliqués.

« Raffiner » les approches expérimentales par une surveillance de façon journalière afin de vérifier tout comportement anormal traduisant une souffrance, comme des signes de prostration ou d'agressivité, et s'il n'y a pas de perte de poids au-delà de 15%. Afin de garantir le bien-être des animaux, le milieu sera amélioré par l'ajout d'un nid végétal et d'un rouleau en carton.

16412 But du projet: la recherche appliquée et translationnelle

Mots clefs : imagerie par résonance magnétique, système glymphatique

Le système glymphatique sert au drainage des déchets du cerveau. Des dysfonctions de ce système ont été mises en évidence dans plusieurs modèles de pathologies dont des modèles de la maladie d'Alzheimer. Actuellement, il est possible de l'étudier grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), une technique indolore et non invasive. Cependant, l'étude du système glymphatique reste majoritairement préclinique car les techniques actuelles nécessitent l'injection de marqueurs dans le liquide cébrospinal ou dans le parenchyme. Les marqueurs utilisés en IRM contiennent du gadolinium et ont des effets neurotoxiques mis en évidence par la Food and Drug Administration. Chez l'Homme, leur administration doit être médicalement justifiée, ce qui restreint considérablement le nombre de sujets. Cependant, il est possible d'exploiter des techniques avancées d'IRM ne nécessitant pas d'agent de contraste. Ainsi, nous pourrions passer des études sur animaux à des observations directes chez l'Homme. Un tel outil serait un atout non négligeable pour l'étude et le diagnostic des pathologies neurodégénératives qui touchent des dizaines de millions de personnes dans le monde.

L'objectif de ce projet est de mettre au point une technique d'IRM permettant l'étude de l'activité du système glymphatique sans agent de contraste, et de la valider en la comparant à une technique de référence d'IRM avec agent de contraste.

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.

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. La souris est l'espèce animale dont le système glymphatique a été le plus étudié. 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. De plus, la nature de notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal anesthésié.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux dans notre étude afin de souscrire au principe de réduction. 110 souris seront nécessaires pour valider la technique que nous souhaitons mettre au point. Cette technique permettra par la suite de réduire considérablement l'invasivité de l'étude du système glymphatique et de réaliser des études chez l'Homme.

Afin de souscrire au principe de raffinement, les animaux seront anesthésiés durant chaque procédure. La douleur suite à une injection intracisternale ou intraventriculaire 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 ».

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 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.

16413 Des études ont montré que les enfants nés avec un petit poids corporel à la naissance (<2,5kg), résultant d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU), sont plus susceptibles de développer des maladies métaboliques à l'âge adulte. L'origine de ces maladies métaboliques pourrait venir d'une altération de la mise en place des réseaux neuronaux du cerveau.

Objectifs : Étudier les effets d'un enrichissement en acides gras oméga 3, pendant la gestation et la lactation, sur la détection centrale des lipides chez le rat RCIU.

Résultats attendus : Mieux comprendre les mécanismes de détection des lipides par le cerveau, mesurer l'impact d'un RCIU sur ces mécanismes à l'adolescence et à l'âge adulte et observer l'effet d'une supplémentation en PUFA pendant la lactation. A long terme, améliorer les stratégies nutritionnelles des bébés RCIU dans les unités de néonatalogie.

Méthodologie : Au maximum 2040 rats Sprague-Dawley. Nous utiliserons des rats nés avec un RCIU obtenu par restriction protéique de l'alimentation des femelles gestantes, que nous étudierons à J30 (adolescence) et J100 (adulte).

Application de la règle des 3R :

Réduire : Nous avons calculé le nombre d'animaux minimum nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement interprétable (n=8). L'utilisation d'un tel nombre devrait nous éviter de devoir répéter l'expérience. Nous utiliserons le même animal, autant que possible, pour tests de tolérance à l'insuline et au glucose et la calorimétrie indirecte.

Raffiner : Les animaux sont au moins 3 par cages (sauf pour les expériences de perfusion et de mesure par calorimétrie indirecte où ils seront individualisés) avec comme enrichissement du milieu de la cellulose leur permettant de déchiqueter, de jouer et de se cacher. La majorité des protocoles ne devrait pas entraîner de souffrance pour les animaux, cependant ils feront l'objet d'une visite quotidienne, y compris le week-end depuis la réglementation de 2010. Les chirurgies feront l'objet d'une attention particulière, et l'usage d'analgésiques avant et après la chirurgie permettra de contrôler la douleur. Une grille comportementale pour chaque animal sera complétée avec des points limites à partir desquels les animaux seront pris en charges pour supprimer leur souffrance ou seront mis à mort si cette souffrance est trop importante (cf Annexe 1). Les animaux seront habitués à la présence de l'utilisateur grâce à une manipulation régulière pour qu'ils ne soient pas stressés lors des expérimentations sur rat vigile, garantissant ainsi des résultats reproductibles associés à un meilleur bien-être animal.

Remplacer : Il s'agit d'une étude *in vivo* et *in vivo* de la détection centrale des lipides par le cerveau dans un modèle RCIU. Hélas, il n'existe pas de méthode alternative permettant de rendre compte de la complexité des mécanismes physiologiques mis en place, comme des modélisations mathématiques ou des modèles *in vitro*. L'utilisation du modèle de rat né avec un RCIU est un excellent modèle d'étude de nutrition périnatale couramment utilisé dans le monde et dans notre unité depuis des années. Notre unité utilise déjà en routine un grand nombre d'outils d'analyse (biologie moléculaire, biologie cellulaire...) spécifiquement adaptés aux rats.

16414 La piroplasmose est l'une des nombreuses maladies transmises par les tiques. En ce qui concerne les mammifères domestiques, la babésiose est une zoonose endémique en France et en Europe chez les chiens, les chevaux et les bovins, elle est plus rare chez les ovins et reste exceptionnelle chez le chat. Les mammifères sauvages quant à eux sont également parasités par les piroplasmes, en particulier les rongeurs et les cervidés. Les animaux domestiques présentent des signes cliniques lors des infections contrairement aux animaux sauvages. Le traitement doit se faire en urgence car la maladie est mortelle si elle n'est pas traitée. Un traitement trop tardif peut s'avérer inefficace. Cette maladie est liée à la multiplication de parasites unicellulaires dans le sang. Les piroplasmes sont des parasites intra-cellulaires obligatoires. Deux grands genres de piroplasmes existent : *Babesia* (responsable de babésiose) n'infecte que les hématies, tandis que *Theileria* (responsable de theileriose) infecte d'abord les cellules nucléées du sang (lymphocytes, monocytes...) puis les hématies.

Les projets de recherche menés par le porteur visent à :

1- améliorer/affiner les méthodes de détection de ces parasites en apportant une connaissance plus approfondie sur les variations génétiques entre souches

2- améliorer la connaissance sur la sensibilité des hôtes par des études sur les interactions cellulaires entre cellules cibles (hématies provenant d'animaux sensibles ou résistants) et variants génétiques du parasite,

3- à proposer à plus long terme des cibles moléculaires à visées diagnostique et vaccinale en conjuguant les connaissances sur leur rôle essentiel dans les interactions parasite-hématie et leur variation génétique et antigénique.

Les recherches sur les babésioses humaines (*Babesia divergens* et *Babesia venatorum*) sont plus avancées, les modèles *in vitro* sont mis en place et la diversité génétique des parasites est mieux connue.

La babésiose humaine est due à plusieurs espèces de *Babesia*, que nous cultivons sur hématies de bovin (*B. divergens*) ou de mouton (*B. venatorum*). Au sein d'une même race, il existe des individus dont les hématies sont sensibles au parasite et d'autres dont les hématies sont « résistantes ». La sensibilité *in vitro* des hématies d'un individu est corrélée à la sensibilité de l'animal à l'infection. La comparaison des étapes d'invasion et de développement des parasites entre ces deux types d'hématies devrait permettre de mieux comprendre les étapes clés de l'infection, les molécules mises en jeu, et ainsi de proposer des méthodes de lutte vaccinale ou médicamenteuse plus ciblées et plus efficaces.

Les projets de recherche sont basés sur la possibilité de cultiver *in vitro* les parasites, et donc sur la possibilité d'avoir accès à du sang d'animaux sains et de sensibilité connue. Les faibles volumes de sang nécessaires à la culture *in vitro* des piroplasmes ainsi que la conservation des hématies à 4°C pendant plusieurs semaines permettent d'espacer et de limiter les volumes prélevés au dessous de seuils physiologiques critiques pour l'animal. Les prises de sang seront réalisées à la jugulaire, par des personnes compétentes.

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.

Réduction : 10 animaux seront utilisés au total, mais un seul sera suffisant pour effectuer 5 prélèvements nécessaires chaque année du projet pour obtenir un nombre suffisant d'échantillons de sang.

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. Les animaux sont maintenus dans leur environnement habituel en troupeau sur aire paillée avec des brosses et des pierres à sel.

16415 L'objectif du projet est de mettre en place un modèle expérimental pertinent d'infection se rapprochant le plus possible de la Covid-19 (Coronavirus disease 2019), une maladie provoquée par un coronavirus, le SARS-CoV-2. Les données cliniques indiquent que la sévérité de la pathologie est plus importante chez l'individu âgé et/ou présentant des comorbidités telles que surpoids/obésité, hypertension, diabète et complications associées.

Aucun système *in vitro* ne reproduit les interactions hôte-virus aboutissant au Covid-19. L'évaluation de la pathogénicité du SARS-CoV-2 pourra aider à développer de nouvelles stratégies de lutte contre cette pathologie, qui nécessite des modèles *in vivo* pertinents qu'il n'est pas possible à ce jour de remplacer par des tests *in vitro* ou *in silico*.

De nombreux aspects de la pathogénicité étant comparables entre l'homme et le hamster, le hamster syrien constitue un modèle pertinent de Covid-19. Par ailleurs, l'évaluation de l'efficacité des composés antiviraux contre SARS-CoV-2 peut être évaluée et validée chez le hamster. Les études *in vivo* sont requises avant tout passage à l'homme.

Des hamsters syriens seront infectés par voie intranasale avec un isolat clinique de SARS-CoV-2 (Laboratoire de Haute Sécurité BSLIII). Nous prélèverons les organes, dont les poumons, et déterminerons la charge virale. Une analyse en histologie nous permettra de quantifier le degré de dommage causé par l'infection. En parallèle, nous mesurerons les fonctions respiratoires et

cardiovasculaires des animaux et doserons les facteurs inflammatoires. La mise en place de ce modèle permettra ensuite de tester l'efficacité des composés antiviraux. Pour cela, l'efficacité des doses sera mesurée en quantifiant la charge virale et certains paramètres liés à la pathologie.

La demande concerne la mise au point du modèle Covid-19 et l'analyse de la physiopathologie chez le hamster adulte jeune (10 semaines), comorbide (20 semaines) et âgé (18 mois) et l'étude des effets des composés antiviraux. Le modèle de comorbidité choisi est un modèle nutritionnel d'obésité. Pour cela les hamsters sont soumis à un régime hyperénergétique enrichi en graisse, cholestérol et fructose. Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R.

Remplacement : il n'existe pas de méthode de substitution pour étudier les effets physiopathologiques de l'infection par SARS-CoV-2 et pour évaluer l'efficacité des drogues antivirales. Le modèle hamster est particulièrement pertinent pour ce type d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe sera utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Les expériences seront répétées 2 fois (5 animaux par groupe expérimental). 1044 hamsters seront nécessaires. 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 compromettre le bien-être animal. Raffinement : Le raffinement est obtenu par (i) la mise au point de procédures rigoureuses, (ii) la formation du personnel, (iii) un suivi quotidien de l'état de santé des animaux, (iv) le recours à des procédures non invasives et non douloureuses.

16416 L'anesthésie buccodentaire est effectuée actuellement de manière invasive via l'utilisation d'une aiguille. Or cette dernière génère douleur et peur du patient. Le but de cette étude est de travailler sur des technologies en rupture permettant de surseoir à l'utilisation d'aiguilles physiques, et de faciliter l'accès au soin en limitant l'invasivité du mode d'anesthésie locale, notamment pour des personnes autistes pour lesquels l'anesthésie générale est souvent la solution retenue avec tous les risques associés.

Les technologies envisagées pour cette évolution sont de nature passive, les microaiguilles, et/ou active, l'iontophorèse. Le principe actif est chargé sur les embouts détachables de micropointes peu douloureuses du fait de leur taille micrométrique. Après retrait du patch support, ces embouts biodégradables demeurent dans les tissus biologiques libérant ainsi de façon contrôlée, par simple diffusion, l'anesthésique. Toutefois, la diffusion passive peut s'avérer trop lente au regard du délai d'efficacité de l'anesthésie attendu par le dentiste. A contrario l'iontophorèse est une méthode de délivrance active mettant en jeu le convoyage du principe actif par l'application d'un champ électrique. L'idée originale de cette proposition tient à la juxtaposition des deux techniques : accélérer la délivrance de l'anesthésique via l'application d'un champ électrique. Des électrodes seraient alors implémentées sur le patch support des microaiguilles afin de « pousser » le principe actif par migration ou électro-osmose. Des études *in vitro* sur cellules de Frantz seront réalisées au préalable pour réduire le nombre de conditions expérimentales à valider *in vivo*.

Avant d'évaluer l'efficacité de cette technique directement chez l'Homme, il est souhaitable de vérifier la bonne diffusion de l'agent anesthésique dans du tissu physiologiquement proche de la gencive humaine. Notre expérimentation sera ainsi réalisée sur 4 jeunes porcs anesthésiés, puis euthanasiés, sur lesquels seront prélevées les gencives au regard du site d'application des patchs afin de quantifier la quantité d'agent anesthésique transférée dans le tissu. Si les résultats de ce premier essai sont pertinents, le groupe sera monté à 20 animaux afin d'évaluer plusieurs modalités d'application et d'obtenir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une étude statistique fiable. 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 sera fait pour pouvoir réutiliser des animaux d'un projet précédent le permettant et notamment après accord de la personne responsable du bien-être des animaux. Tout au long de leur séjour dans notre établissement, une attention particulière sera portée au bien-être de ces porcs qui seront hébergés dans la mesure du possible 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. Lors de

l'expérimentation, le tissu gingival devra être prélevé afin d'évaluer la diffusion de l'agent anesthésiant ; les animaux seront donc anesthésiés, suite à une prémédication, afin d'éviter tout stress et toute souffrance jusqu'à leur décès, induit sans reprise de conscience.

16417 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie dans laquelle la pression du sang à l'intérieur de l'artère pulmonaire, qui relie le cœur aux poumons, est anormalement élevée à cause d'un rétrécissement des petites artérioles pulmonaires. Cette augmentation impose un effort au cœur qui à terme peut cesser de fonctionner. Bien que l'on ne sache pas guérir cette maladie qui menace la vie du malade, l'utilisation de médicaments qui ciblent la voie des intégrines pourraient représenter un réel espoir. On sait aujourd'hui, en effet, que les récepteurs d'adhésion cellulaire, (également appelés intégrines) jouent un rôle très important dans la migration, la différenciation et la survie des cellules, trois phénomènes perturbés dans l'HTAP. Nous avons obtenu des résultats sur des échantillons pulmonaires humains et des cultures de cellules qui indiquent qu'effectivement les intégrines sont anormalement surexprimées à la surface des cellules constituant la paroi des vaisseaux dans l'HTAP. L'objectif de ce projet est donc de tester l'implication des intégrines dont l'intégrine alpha V (également appelée ITGAV) dans la mise en place de l'HTAP. Ainsi l'utilisation d'un modèle murin sera nécessaire pour obtenir un modèle approprié permettant d'étudier *in vivo* et de façon intégrée la maladie humaine. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de réduire, remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier les relations entre le système immunitaire et le système cardiovasculaire uniquement par des systèmes *in vitro* ou *in silico*. Le modèle animal d'hypoxie chronique a été soigneusement conçu et évalué pour fournir des informations directement pertinentes pour l'application future à l'homme. De plus, ce modèle étant bien établi, il possède alors l'avantage de permettre de réduire au maximum le nombre d'animaux du fait de la connaissance et la précision des paramètres observés. Au cours de ce projet d'une durée de 5 ans, 56 souris dépourvues (Knock Out ou KO) en ITGAV ou non seront exposées à de l'hypoxie durant une période de trois semaines pour comprendre le rôle de la surexpression de ces intégrines dans le rétrécissement des artérioles pulmonaires, et donc, au développement et à la progression de l'HTAP. Pour s'assurer du bien-être animal, un score prenant en compte l'apparence, le poids et le comportement des animaux sera mis en place et ils seront logés dans un environnement avec une humidité relative, une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement.

16418 L'immunothérapie constitue un véritable espoir dans le traitement de nombreux cancers, notamment dans ceux sans prise en charge efficace actuellement. Ce traitement consiste principalement en l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules tumorales ou leur microenvironnement afin de limiter la croissance tumorale. Plusieurs types d'anticorps monoclonaux peuvent être utilisés dans ce but, sous réserve que le patient présente bien la protéine ciblée au sein de sa tumeur. D'autres anticorps monoclonaux ont une action immunomodulatrice en levant le mécanisme d'inhibition du système immunitaire induit par la tumeur. Ces mécanismes sont communs à plusieurs cancers et ces traitements récents ont des indications dans déjà sept types de cancers :

, maladie de Hodgkin et maladie de Merkel et sont actuellement évalués dans de nombreux autres cancers. Bien que des réponses remarquables et prolongées aient pu être observées chez des patients atteints de cancers avancés métastatiques, un nombre important de patients (80 à 60% selon les cancers) restent réfractaires au traitement. Il semblerait que les tumeurs génétiquement instables avec un fort de mutation ou fortement infiltrées par les lymphocytes T (tumeurs chaudes) soient les plus vulnérables à l'immunothérapie.

Nous avons développé une nouvelle génération d'anticorps polyclonaux glyco-humanisés permettant de s'affranchir des effets délétères de la réponse anti-carbohydate et de l'intolérance inhérente à l'utilisation d'anticorps polyclonaux chez l'homme. Nos polyclonaux oncolytiques ont démontré dans des modèles syngéniques pré-cliniques leur innocuité et leur efficacité thérapeutique en transformant les tumeurs « froides » en tumeurs « chaudes » et leur synergie avec les immunomodulateurs.

L'objectif de cette étude est de démontrer l'efficacité de nos anticorps polyclonaux oncolytiques sur la pousse tumorale dans des modèles de xénogreffes tumorales chez la souris NMRI-nude. Nous évaluerons ainsi l'efficacité thérapeutique d'anticorps polyclonaux générés chez 2 espèces différentes (porc et lapin) dans 5 modèles de cancer. Un nombre total de 150 souris NMRI nude sera utilisée pour cette étude.

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

- Réduire: le nombre de souris est réduit au minimum afin de permettre la reproductibilité et l'analyse des résultats par tests statistiques
- Remplacer: Du fait du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, la validation d'un traitement par anticorps polyclonaux ne peut s'effectuer que dans un modèle *in vivo*.
- Raffiner: des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place selon la procédure. Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos vouté, agressivité...) sera réalisé. Les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal-être tel qu'un changement de comportement ou de souffrance pourront être euthanasiés. 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'enfourir et se cacher

16419 Avec plus de 200 millions d'actes par an à travers le monde, l'anesthésie générale est devenue une procédure sûre dont le risque de complications immédiates est faible. Cependant, depuis une décennie se pose la question d'effets indésirables liés à l'anesthésie générale et survenant à distance de sa réalisation. En effet, des travaux cliniques ont associé anesthésie générale avant l'âge de 4 ans et troubles du développement neurocognitif chez l'enfant. Chez l'adulte, deux cadres nosologiques ont été étudiés : la dysfonction cognitive post-opératoire (DCPO) et la démence. Des études cliniques ont mis en lien la DCPO chez la personne âgée et l'anesthésie générale et ont montré un lien avec des suites post-exposition défavorables. D'autre part, la recherche clinique et pré-clinique a montré une accélération de la pathologie Tau et de l'agrégation du peptide bêta amyloïde après exposition à des anesthésiques. Ces deux phénomènes sont observés dans la démence de type Alzheimer. Il n'existe actuellement pas d'explication consensuelle pouvant expliquer de tels effets liés à l'anesthésie.

Récemment a été découvert un système de nettoyage des déchets métaboliques du cerveau appelé glymphatique. Ce système, médié par le liquide cérébro-spinal (LCS), est immature dans l'enfance et semble montrer une moindre activité lors du vieillissement physiologique. Nous avons par ailleurs montré la diminution de son activité lors d'une anesthésie générale.

Nous faisons ici l'hypothèse d'une altération de la maturation du glymphatique dans les suites d'une exposition juvénile aux agents anesthésiques et d'une altération de son fonctionnement au décours d'une exposition à ces mêmes agents à l'âge adulte conduisant au développement précoce et/ou quantitativement plus important de lésions amyloïdes ou à l'accélération de la pathologie Tau chez des souris prédisposées. Un retentissement fonctionnel sera également étudié au moyen d'évaluations cognitives. Les animaux utilisés pour mener à bien ce projet seront des souris de type C57Bl/6J adultes et Swiss juvéniles, issus ou non de souris Swiss gestantes, des souris APP/PS1 génétiquement modifiées pour développer une amyloïdie dès l'âge de 5 mois ainsi que des souris Tau hyper productrice de cette protéine. La procédure d'anesthésie générale sera réalisée par exposition à de l'isoflurane, un gaz anesthésique, durant 2 heures par jour, 4 jours consécutifs. L'exploration du système glymphatique sera réalisée au moyen de l'imagerie par résonance magnétique après injection de produit de contraste dans le LCS et par injection de traceurs en intracérébrale avant évaluation de leur élimination par fluorescence dans le proche infra-rouge (NIRF) ou en histologie. Les dépôts de peptide β -amyloïde seront étudiés grâce à la micro-TEP après injection d'un radio-traceur fixant ces dépôts et par mesure de la radioactivité après injection intra-parenchymateuse de β -amyloïde marqué à l'iode radioactive. Les moyens utilisés pour mettre en évidence un retentissement de l'anesthésie générale sur la cognition des animaux sont des tests comportementaux explorant la mémoire, l'anxiété, la coordination motrice et motricité globale. Le nombre total d'animaux prévu est de 190 souris C57Bl/6J

adultes, 190 souriceaux Swiss, 8 souris Swiss gestantes, 140 souris APP/PS1 et 130 souris Tau, soit 658 animaux au total.

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):

-Remplacer : le modèle *in vivo* est indispensable pour étudier les effets de l'anesthésie sur le cerveau en développement ainsi que sur le cerveau âgé. Atout majeur pour ce projet, il permet également une étude longitudinale sur plusieurs mois. Parmi les différents modèles *in-vivo* existant, la souris est actuellement la seule espèce animale chez qui le système glymphatique a été étudié. Elle est également le modèle privilégié utilisé en recherche pré-clinique sur la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, ce modèle n'est pas remplaçable et s'avère même indispensable pour mener à bien ce projet.

-Réduire : le nombre de souris nécessaires a été déterminé au moyen de 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.

-Raffiner : 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 mesures pour réduire au maximum toute forme d'inconfort et de souffrance sont le suivi strict et rapproché des animaux, l'hébergement en petits groupes sociaux stables (n=5) avec un enrichissement minimum et la manipulation uniquement par du personnel expérimenté. 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). Les animaux sont sous l'attention quotidienne du personnel de l'animalerie. Si l'animal présente des signes de souffrance ou de détresse, il sera mis à mort sous anesthésie profonde.

16420 Des liens entre microbiote intestinal et comportement, dont le comportement alimentaire, ont été suggérés dans de nombreux travaux. Nous avons mis en évidence des modifications du plaisir alimentaire chez des souris lorsqu'elles sont exposées plusieurs fois à un régime gras et sucré. En parallèle, nous avons observé des modifications du microbiote intestinal de ces souris. Notre objectif est d'évaluer un éventuel lien de cause à effet entre ces modifications du microbiote intestinal et de comportement alimentaire chez la souris soumise à des expositions répétées au régime gras et sucré. Pour cela, quarante-huit souris C57Bl/6N seront hébergées en cages individuelles afin de permettre un suivi quotidien de leur consommation alimentaire. Elles seront soumises à un transfert du microbiote provenant de souris ayant subi plusieurs expositions à un aliment gras et sucré ou n'ayant jamais été exposées à cet aliment. L'implantation du microbiote sera suivie pendant 3 semaines par analyse du microbiote fécal. Après 3 semaines, la moitié des souris sera exposée à l'aliment gras et sucré et leur comportement alimentaire et leur métabolisme énergétique évalués pendant 3 jours. L'autre moitié des souris sera euthanasiée pour prélever des tissus.

Ce projet suit la règle des 3R. Remplacement: le recours à l'expérimentation animale est justifié par l'impossibilité de modéliser *in vitro* ou *in silico* les liens entre composition du microbiote, cerveau et comportement alimentaire. Réduction: l'utilisation du modèle souris permet de bénéficier des nombreuses données et méthodologies existantes sur ce modèle. Le nombre d'animaux prévu permet d'effectuer des tests statistiques appropriés. Raffinement: l'anxiété liée à l'isolement en cages individuelles des souris sera minimisée par un enrichissement du milieu. Les procédures nécessitant une contention ou un gavage seront précédées d'une habitude des animaux à ces gestes.

16421 Le poste alimentaire représente 65 à 95% des impacts environnementaux des élevages de porcs. Formuler des aliments à moindres impacts avec un surcoût limité (écoaliments) semble être une solution innovante pour améliorer la durabilité des systèmes agricoles. Les écoaliments ainsi formulés diffèrent des aliments classiques par une forte proportion de co-produits et certains protéagineux. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact de ces écoaliments en élevage de porcs au travers de deux essais. L'essai 1 permettra d'évaluer l'impact des écoaliments sur les performances de croissance des porcs en engraissement (essai 1, 4 régimes expérimentaux, n=20 animaux par régime et 20 animaux

de réserve, soit un total de 100 animaux). Les porcs seront logés dans une salle équipée d'un distributeur automatique d'aliment et d'un système de pesée automatique permettant de mesurer les performances individuelles d'animaux élevés en un seul groupe proche des conditions d'élevage. Le 2ème essai permettra de mesurer l'utilisation digestive des écoaliments en chambre respiratoire (essai 2, 4 régimes expérimentaux, n=6 porcs par régime, soit un total de 24 animaux). Cet essai se fera en 12 répétitions de 2 porcs, ils seront logés individuellement dans des cages à digestibilité (dimensions : 77X125cm) pendant 21 jours (7 jours d'adaptation + 14 jours de collecte des fèces et des urines) et ils passeront les 7 derniers jours en chambre respiratoire (12 m³, dimension : 1.8m x 1.8m x 2.5m) afin de mesurer les émissions gazeuses (O₂, CO₂, CH₄, NH₃). La récupération des déjections permettra également d'évaluer le potentiel de production de biogaz à partir des effluents dans l'objectif d'optimiser leur valorisation. L'essai 2 a été arrêté mi-mars suite à la situation sanitaire. Nous voudrions redémarrer l'essai avec 6 répétitions de 2 animaux (au total 12 animaux supplémentaires). Ce qui portera le nombre total d'animaux utilisés à 36 dans l'essai 2.

Le projet a été élaboré dans le respect des 3R. Remplacer : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est d'évaluer la digestibilité et la réponse des porcs aux écoaliments et il n'est pas possible d'étudier cet aspect autrement que sur un animal entier et vivant. Réduire : le nombre d'animaux dans chaque essai 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 évaluer avec précision l'effet des écoaliments en élevage de porcs. Raffiner : la collecte totale des déjections sur des animaux entravés est à l'heure actuelle la seule méthode permettant de mesurer la digestibilité d'un aliment avec une grande précision. Les cages (dimensions : 77*125cm) dans lesquelles seront hébergés les animaux seront équipées de barreaux et seront toutes placées dans la même pièce pour maintenir un contact visuel, auditif et olfactif entre les porcs. L'appétit, l'ingestion d'eau, le comportement des animaux ainsi que l'état de la cage seront observés au moins deux fois par jour par le personnel technique afin de détecter des blessures éventuelles, des diarrhées ou des troubles respiratoires. Tout animal présentant l'un de ces troubles fera l'objet d'une prise en charge immédiate. Lors de la mise à mort des animaux, une pré-anesthésie sera réalisée par injection IM de kétamine (Imalgène 1000, intramusculaire ; 15mg/kg).

16422 Les gangliosides sont des glycolipides (lipides sucrés) particulièrement abondants dans le cerveau et le tissu nerveux des animaux. Ils jouent un rôle majeur dans le fonctionnement et le maintien de l'intégrité du système nerveux. Des désordres du métabolisme des gangliosides sont en effet à l'origine de dysfonctionnements neurologiques graves chez l'homme.

Les souris transgéniques déficientes en gangliosides sont des outils uniques qui permettent de préciser ce rôle majeur des gangliosides dans les tissus nerveux tout au long de la vie. Il s'agit notamment de deux modèles invalidés pour des enzymes de biosynthèse des gangliosides (GM2/GD2 synthase et GD3 synthase). Il a été montré que ces animaux présentent des dysfonctionnements nerveux dont la nature et la gravité dépendent du modèle et de l'âge: troubles moteurs, diminution de sensibilité, baisse des capacités de régénération après dommages des nerfs...

La structure et la fonction de la rétine ont été très peu étudiées chez ces modèles murins. Pourtant, la rétine, tissu majeur de la vision, est un prolongement direct du système nerveux central. Il est donc fort probable que ce tissu présente des altérations chez ces animaux. Nos premières observations n'ont pas mis en évidence de défauts majeurs à 8 ni à 25 semaines. C'est pourquoi l'objectif de ce projet est d'étudier la structure et la fonction rétinienne chez des souris transgéniques déficientes en gangliosides âgées (62 semaines) ainsi qu'en réponse à un stress de la rétine (modèle de NOIA, neuropathie optique ischémique antérieure conduisant à la mort d'une population de cellules nerveuses). La fonction rétinienne sera évaluée par électrorétinographie sur animaux anesthésiés. La structure de la rétine sera ensuite examinée par angiographie puis par des techniques d'histologie et de biologie moléculaire après mise à mort des animaux et dissection de la rétine. Ces procédures, pratiquées en routine dans notre laboratoire, seront réalisées dans des conditions optimales.

A la lumière des travaux publiés sur ces mêmes modèles ainsi que de la variabilité observée dans notre laboratoire pour les procédures d'exploration rétinienne, nous utiliserons 8 individus par groupe. Le nombre total d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet de 5 ans a été estimé, dans le respect

des règles de réduction, à 256. Des anesthésiques et analgésiques adéquats seront utilisés pour toute procédure risquant d'induire une douleur. Les animaux seront manipulés dans le souci de réduire au maximum leur stress et souffrance. Les points limites clairement définis conduiront à la mise à mort des animaux au cas où les souffrances ne pourraient être soulagées. Les expérimentateurs, le personnel de l'animalerie ainsi que les membres de la Structure chargée du Bien-Etre Animal (SBEA) du laboratoire veilleront aux conditions optimales d'hébergement et d'utilisation des animaux.

Ces travaux permettront de clarifier le rôle, encore mal connu, des gangliosides dans la structure et la fonction de la rétine. Ils permettront ainsi de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de maladies neurodégénératives de la rétine, voire d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques, via les gangliosides, pour ces maladies dont les traitements sont à ce jour peu satisfaisants.

16423 Les cellules du système immunitaire jouent un rôle clé dans le contrôle de la progression tumorale et de la réponse aux traitements au cours des cancers. Parmi ces cellules, les macrophages représentent la population immunitaire majeure. Les macrophages peuvent changer de phénotype et de fonction selon les stades du développement tumoral. En effet, au cours de la progression tumorale, les macrophages basculent d'un phénotype anti-tumoral vers un phénotype favorisant la progression tumorale et les métastases. A ce stade tardif, les macrophages sont corrélés à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers et semblent ainsi représenter des cibles thérapeutiques intéressantes.

L'objectif de notre étude sera de mettre en évidence dans un modèle expérimental murin d'adénocarcinome ovarien, déjà décrit dans la littérature, les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des macrophages au cours de la progression tumorale. Nous rechercherons alors l'effet de différents agents pharmacologiques pouvant moduler les fonctions des macrophages afin de favoriser l'élimination du cancer.

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. Après l'injection des cellules tumorales, les souris seront surveillées quotidiennement et le suivi du poids, prostration, apathie, ventilation, comportement, aspect des poils, piloerection une fois par semaine. Lors de l'adénocarcinome ovarien, un liquide d'ascite s'accumule dans le péritoine lors des stades tardifs de la progression tumorale. Les animaux seront euthanasiés si la prise de poids est supérieure à 40% du poids initial, si

les animaux présentent des signes de mutilations, des difficultés respiratoires. Dans le cas où les animaux perdraient du poids, ils seront euthanasiés si la perte de poids est supérieure à 20% du poids initial. Ce projet a précédemment obtenu l'accord du comité d'éthique et du ministère dans un autre établissement. Les études effectuées nous ont permis de maîtriser ce modèle murin permettant de réduire le nombre d'animaux et de mieux appréhender les points limites pour le bien-être des animaux. 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 tumoral sont complexes. Ainsi, cette étude permettra d'étudier dans leur contexte physiopathologique les macrophages, cibles thérapeutiques potentielles, et ne peut pas être mimée par une approche de culture cellulaire. En effet, les mécanismes impliqués dans la polarisation des macrophages et nécessaires au développement tumoral sont complexes. Ils requièrent la mobilisation de différents médiateurs cellulaires et moléculaires et ne peuvent pas être mimés par une approche de culture cellulaire

Le nombre d'animaux utilisé correspond au nombre minimal permettant une interprétation sans ambiguïté des résultats. Les groupes d'animaux constitués de 6 individus permettront une étude statistique (test Bonferroni-Dunnet). L'ensemble de cette étude comprendra 756 souris C57Bl/6J.

16424 L'hyperplasie congénitale des surrénales est une maladie héréditaire due à l'inefficacité d'une protéine, la 21-hydroxylase (CYP21), à cause de mutations dans son gène. Ce déficit entraîne une production anormale des hormones par les glandes surrénales. La forme la plus sévère se caractérise par une déshydratation avec perte de sel pouvant conduire, en l'absence de traitement approprié, au décès du

patient, en particulier chez le nouveau-né. Les deux sexes sont touchés, développant une puberté précoce accompagnée d'un arrêt de la croissance. Chez les filles, une surproduction d'androgènes (hormones mâles) entraîne une ambiguïté sexuelle et une virilisation chronique. Actuellement, le seul traitement existant est un traitement hormonal substitutif, devant être pris plusieurs fois par jour et à vie. Celui-ci s'avère très contraignant dans le quotidien des patients, déjà lourdement impactés par les conséquences physiologiques de la maladie. Par ailleurs, ce traitement ne bloque pas suffisamment la synthèse des hormones masculinisantes pour éviter la virilisation des filles.

L'objectif du projet est de finaliser les essais de thérapie génique réalisés ces dernières années sur le primate non humain ainsi que sur un modèle de souris présentant la maladie et visant à rétablir la synthèse d'une CYP21 fonctionnelle par administration d'une copie normale du gène, de façon à rétablir la production hormonale des glandes surrénales.

Nos premiers travaux ont permis de prouver que l'introduction d'une copie fonctionnelle du gène chez des souris déficientes pour CYP21 permettait une production de la protéine CYP21 en quantité faible mais suffisante pour améliorer significativement l'état général des animaux (prise de poids, taux hormonaux se rapprochant de ceux des souris normales).

Ce projet vise à démontrer qu'une unique injection du vecteur clinique (un virus non pathogène permettant le transfert du gène normal au sujet malade et qui sera utilisé en phase I sur des patients adultes) permet, chez notre souris modèle, une prise de poids reflétant la compensation du déficit en 21-hydroxylase. Le traitement doit permettre d'améliorer la réponse au stress (analyse de leur curiosité ou de leur anxiété dans un environnement nouveau), de rétablir des niveaux d'hormones comparables aux souris saines (comparaison des taux sanguins d'hormones avant et après l'injection ou dans les urines récupérées régulièrement). Le projet vise aussi à déterminer la persistance du vecteur et de ses effets, ainsi qu'à évaluer ses effets sur de jeunes sujets en vue des essais chez les enfants.

Nous testerons aussi chez notre souris modèle un second vecteur, en cours de développement, capable de s'exprimer plus spécifiquement dans les glandes surrénales. Avec ce nouveau vecteur, nous espérons induire une production plus importante de la protéine CYP21 au niveau des glandes surrénales, ce qui permettrait de diminuer les doses du traitement à injecter aux patients.

L'utilisation du modèle souris se justifie par le fait qu'il existe une souche avec un défaut génétique induisant un déficit en 21-hydroxylase. Chez ces souris, les caractéristiques de la maladie sont très similaires à celles observées chez l'humain (taux d'hormones, perte de sel, taille) et leur correction par le traitement peut être étudiée facilement. C'est l'unique modèle animal de la maladie connue. La génération d'animaux porteurs de ce défaut de CYP21 (par croisement d'animaux hétérozygotes non malades) est une étape nécessaire pour tester l'efficacité d'un traitement.

L'évaluation fonctionnelle du traitement sera étudiée par des techniques indolores et non-invasives (pesées, études comportementales).

Une observation quotidienne des animaux, des pesées hebdomadaires et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet (184 animaux comprenant 144 animaux présentant la maladie et 40 animaux contrôles) sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet thérapeutique du traitement.

Remplacement : Des études *in vitro* sur des cellules de surrénales déficientes en 21-hydroxylase ont déjà été menées. Cependant, elles ne nous permettent pas d'évaluer l'efficacité de la protéine produite à l'échelle d'un organisme vivant, dans le contexte d'une physiologie complexe des glandes endocrines. Ces études ne permettent pas de vérifier si la protéine est produite en quantité suffisante pour corriger la maladie, si elle est suffisamment efficace pour corriger tous les paramètres physiologiques, ou encore si cette correction est-elle durable dans le temps.

Réduction : La mutation génétique entraîne une mort prématurée des souriceaux présentant la maladie, dans les premiers jours suivants leur naissance, comme cela peut se produire chez l'humain.

Un traitement hormonal administré aux souris gestantes dans l'eau de boisson (aucune manipulation des animaux et ne modifiant pas son appétibilité), et aux souriceaux par voie sous-cutanée, dès la naissance, est indispensable à la survie des souriceaux malades.

Ces traitements substitutifs, ainsi que les mesures pour prévenir le rejet des petits par les mères, visent à limiter les décès des malades et donc le nombre de petits à faire naître pour constituer des groupes d'animaux malades auxquels sera administré le vecteur thérapeutique.

Les effectifs des groupes pour tester les traitements de thérapie génique seront réduits au minimum, notre expérience nous permettant d'évaluer leur efficacité sur 8 animaux par groupe au maximum. Les données des souris contrôles obtenues lors de la première partie du projet nous serviront autant que possible pour la suite du projet de façon à limiter ces groupes contrôles.

Raffinement : Il est important de procéder à l'injection d'hormones de substitution aux nouveau-nés aussi rapidement que possible après la naissance, dans les 24h qui suivent la mise-bas. Ce traitement des nouveau-nés nécessite une manipulation régulière des petits durant leurs premiers jours de vie. Bien que le geste soit peu invasif et rapide, c'est un facteur de stress pour les nouveau-nés et pour la mère. Des règles précises sont préconisées pour l'administration du traitement et le nombre d'injections a été réduit au minimum afin de limiter la manipulation des petits sans pour autant risquer leur perte.

Pour l'administration des vecteurs thérapeutiques, des protocoles anesthésiques et d'analgésie adaptés seront mis en place selon la procédure et validés par le vétérinaire.

L'administration expérimentale (1 seule injection par animal) ainsi que les deux prélèvements sanguins, se dérouleront sous anesthésie générale par isoflurane.

16425 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 à base d'ensilage de maïs en substituant la complémentation en concentrés (tourteau de soja) par de l'herbe verte, en système bovin lait. Pour approfondir cette question, deux essais seront conduits à l'automne (2020 et 2021) 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 avec ou sans tourteau de soja. Ils seront réalisés à l'auge afin de pouvoir mesurer précisément les flux d'azote (ingéré et excrété) à l'échelle individuelle et de la journée. Durant ces essais, nous allons mesurer ou estimer les différents flux de matières, et principalement d'azote et d'urée, à l'échelle de l'animal. Ces essais respecteront 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 inversion ainsi que l'analyse statistique des données permettront de répondre aux objectifs scientifiques tout en limitant le nombre d'animaux à 8 chaque année (soit 16 au total) 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.

16426 Le but de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'une chimiothérapie transportée par des nanoparticules, sur des animaux porteurs d'un glioblastome. Cette chimiothérapie sera assistée par l'ouverture de la barrière hémato encéphalique et la libération contrôlée du principe actif grâce à des ultrasons focalisés de haute intensité.

Le glioblastome compte parmi les tumeurs cérébrales primitives les plus communes et reste actuellement incurable malgré une prise en charge combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Il existe donc un besoin important de nouvelles options thérapeutiques dans cette pathologie. Dans ce contexte, une vectorisation des actifs anticancéreux existants permettrait

d'améliorer leur efficacité thérapeutique ainsi que leur profil de tolérance, en favorisant la libération de la molécule active au niveau tumoral et en minimisant celle-ci ailleurs dans l'organisme.

Nous avons développé des nanoparticules capables de transporter des molécules anticancéreuses telles que le docétaxel (DTX), qui est actif *in vitro* sur les cellules de glioblastome et déjà utilisé face à plusieurs autres types de cancers. Ces nanoparticules à base de perfluorocarbures sont d'une taille inférieure à 100 nanomètres, et permettent une libération contrôlée de principe actif. En effet, leur exposition à une stimulation ultrasonore accélère la libération du médicament qu'elles contiennent. L'application d'ultrasons à une région donnée de l'organisme permettra donc de contrôler précisément le site de libération du médicament, et ainsi de mieux contrôler ses effets.

D'autre part, l'efficacité sur le glioblastome des chimiothérapies existantes est limitée par la faible pénétration des médicaments dans le cerveau. Mais nous pouvons obtenir une perméabilisation temporaire et localisée du cerveau par application d'ultrasons grâce à un dispositif adapté au petit animal. Ainsi, nous pouvons favoriser le passage des médicaments anticancéreux au niveau tumoral.

Nous avons démontré *in vitro* la biocompatibilité des nano-gouttes et de leurs différents composants sur plusieurs modèles cellulaires. De plus, les doses employées seront inférieures aux doses toxiques déjà connues pour chaque constituant des nano-gouttes, et des expériences préliminaires réalisées par d'autres équipes avec les mêmes nano-gouttes n'ont pas mis en évidence de toxicité chez l'animal.

Plusieurs étapes seront nécessaires préalablement à l'évaluation de l'efficacité du traitement. Au total, pour la détermination de la dose maximale tolérée, l'étude pharmacocinétique, l'optimisation des conditions de perméabilisation et de libération contrôlée, et enfin l'étude d'efficacité, 483 souris C57BL/6 seront requises.

Ce projet a été conçu dans le respect des principes des 3R. Concernant le principe de remplacement : les modèles animaux restent encore aujourd'hui irremplaçables en oncologie, notamment en raison du rôle crucial joué par le système immunitaire dans la croissance tumorale, et qui ne peut à ce jour être modélisé de façon satisfaisante *in vitro*. Nous utiliserons en particulier la souris, dont l'utilité en tant que modèle en oncologie est largement reconnue dans la littérature scientifique. Concernant le principe de réduction : le nombre d'animaux dans chaque expérience a été réduit au nombre minimum permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Ce nombre a été estimé grâce à un modèle statistique (<https://biostatgv.sentiweb.fr/?module=etudes/sujets>) en estimant a priori la magnitude de l'effet des traitements et la variabilité des résultats futurs grâce aux résultats d'expériences antérieures similaires, et en fixant à 80 % la probabilité d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Concernant le principe de raffinement : la nécessité du bien-être animal sera prise en compte par le respect des normes d'hébergement (qui concernent entre autres : la ventilation, la température, l'éclairage, le bruit, la surveillance sanitaire, le type et la taille et l'enrichissement des cages, l'alimentation... et sont consultables en ligne à l'adresse suivante : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027037983&categorieLien=id>), par l'utilisation d'une anesthésie et d'une analgésie appropriées lors des procédures, ainsi que par la surveillance quotidienne des animaux (recherche de signes précoces de douleur par évaluation visuelle de l'état de santé : comportements, mouvements, postures, expression faciale, état du pelage...), et leur mise à mort en cas d'atteinte des points limites (signes précoces de souffrance définis dans une grille de score, perte de poids supérieure ou égale à 20%).

16427 L'augmentation de l'obésité dans la population mondiale représente un enjeu de santé majeur. L'obésité est notamment à l'origine du diabète de type II et s'accompagne de complications cardiovasculaires.

La contraction cardiaque, nécessaire pour faire circuler le sang dans l'organisme, repose sur la libération de calcium dans les cellules cardiaques. Ce calcium sert d'une part à provoquer la contraction mais aussi à adapter la production d'énergie à l'effort demandé. Ce sont les mitochondries qui produisent l'énergie dont la cellule a besoin en consommant les nutriments apportés par l'alimentation et l'oxygène que nous respirons. Au cours de la contraction, une partie du calcium est captée par les mitochondries pour augmenter la production d'énergie nécessaire à la fonction cardiaque. Le calcium pénètre dans les mitochondries grâce à un complexe qui forme un canal. Le bon fonctionnement du

muscle cardiaque repose sur un équilibre parfait des flux de calcium. Au cours du diabète, un dysfonctionnement du complexe d'import de calcium mitochondrial est à l'origine d'une perturbation de la production d'énergie qui aboutit à la dysfonction cardiaque. Ces transferts de calcium représentent donc une cible thérapeutique potentielle pour limiter les complications cardiovasculaires au cours du diabète.

Ce projet a pour but de préciser le rôle des différents composants de ce complexe de transport du calcium en empêchant leur production dans les cellules cardiaques et d'évaluer ainsi leur impact sur la dysfonction cardiaque. Pour chacun des constituants ainsi supprimés, nous étudierons les retentissements à court (15 jours) et moyen terme (3mois) sur la fonction cardiaque en suivant l'activité électrique du cœur et son fonctionnement. La moitié des animaux sera incluse dans un modèle d'obésité et de diabète induit par un régime riche en graisses et en sucre afin de préciser le rôle des composants du complexe de transport de calcium dans les mitochondries dans le développement et la progression des complications cardiovasculaires associées au diabète.

Les expériences de ce projet seront réalisées sur des souris (nombre estimé : 420 sur 5 ans) en respectant le principe des 3R. Les expériences sont rigoureusement planifiées afin d'obtenir le maximum d'informations tout en réduisant au strict minimum le nombre d'animaux nécessaires. Raffinement : les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi et étroitement surveillés pour chacune des procédures. Des points limites sont établis afin de réduire au strict minimum la détresse qui leur est imposée. Remplacement : Des données *in vitro* ont déjà été obtenues mais ces modèles alternatifs ne permettent pas de récapituler la complexité du fonctionnement électrique et mécanique du cœur dans sa globalité. Si de nouvelles approches alternatives étaient identifiées pendant la durée de ce projet, notre stratégie serait immédiatement revue et nos méthodes expérimentales seront remplacées.

16428 La mitose permet la division d'une cellule mère et la répartition fidèle du matériel génétique entre les deux cellules filles. La ségrégation fidèle des chromosomes repose sur le fuseau, une structure bipolaire composée de microtubules. La morphologie du fuseau, et notamment sa taille et son architecture, est essentielle pour sa fonction. Cependant, malgré des décennies d'étude, on ignore encore comment le fuseau adopte une morphologie optimisée pour sa fonction.

Pour étudier cette question, nous utiliserons deux espèces de Xénope de différentes tailles, *X. laevis* et *X. tropicalis*, qui nous permettront d'obtenir les ovocytes servant à la préparation d'extraits cytoplasmiques. Ces extraits sont uniques et extrêmement intéressants car ils sont capables de reconstruire des structures de microtubules de tailles et de structures différentes. De tel assemblages microtubulaires ne peuvent être réalisés qu'avec ces extraits d'ovocytes. De plus ce projet repose sur l'étude comparative de ces deux espèces. C'est pourquoi aucune autre méthode, y compris les extraits de cellules en culture, ne peut être utilisée comme substitut. Ce projet n'implique ni fécondation des ovocytes, ni sacrifice animal, et l'utilisation des grenouilles se limite à deux injections hormonales d'hCG. L'hormone est dissoute dans une solution saline stérile pour assurer une osmolarité physiologique et injectées dans le sac lymphatique dorsal. Les grenouilles sont manipulées avec des gants en nitrile humide et reposent sur une surface humidifiée pendant les injections pour éviter tout dommage à leur peau. L'injection se fait avec la plus petite aiguille possible et rapidement pour éviter tout stress à l'animal. Les animaux restent au repos entre les injections avec un intervalle d'au moins 6 mois pour *X. laevis* et d'entre 3 et 4 mois minimum pour *X. tropicalis*. Comme chaque grenouille pond plusieurs milliers d'ovocytes par ponte, seulement 3 *X. laevis* ou 5 *X. tropicalis* sont nécessaires par expérience et chaque extrait peut être utilisé pour plusieurs expériences parallèles. Compte-tenu de ces paramètres et la possibilité de réutiliser les femelles sans danger pour l'animal, nous pourrions limiter notre utilisation sur 5 ans à 60 femelles *X. laevis* et 70 femelles *X. tropicalis*.

La règle des 3R (Remplacement/Réduction/Raffinement) est appliquée en :

Remplacement: La génération *in vitro* des assemblages microtubulaires étudiés ne peut être réalisé qu'avec ces extraits d'ovocytes, de plus ce projet repose sur l'étude comparative entre *X. laevis* et *X. tropicalis*. C'est pourquoi aucune autre méthode, y compris les extraits de cellules en culture, ne peut être utilisée comme substitut.

Réduction: Les intervalles de repos entre les ovulations permettent d'obtenir une qualité et quantité d'ovocytes élevées, et ainsi d'utiliser moins d'animaux. De plus, le nombre de grenouilles utilisées par session est strictement adapté aux expériences prévues. Enfin, compte-tenu que les ovocytes de *X. laevis* génèrent plus d'extrait cytoplasmique par animal que *X. tropicalis*, ils seront utilisés en priorité pour optimiser les différents protocoles et ainsi minimiser le nombre total d'animaux utilisés.

Raffinement: Les installations qui héberge les grenouilles sont agréées et tous les efforts (soins optimaux, réservoir, eau, température, etc.) sont faits pour minimiser la souffrance, la détresse potentielle et améliorer le bien-être animal.

16429 Le Gliome Pontique Diffus Intrinsèque (DIPG) est une tumeur pédiatrique du système nerveux central (SNC). Elle est la première cause de mortalité infantile par tumeur du SNC. L'arsenal thérapeutique pour traiter cette tumeur est très limité : à ce jour seule la radiothérapie à visée palliative constitue la prise en charge. La chirurgie de résection ne peut être pratiquée du fait du caractère infiltrant de la tumeur, et les chimiothérapies efficaces *in vitro* ont une efficacité nulle *in vivo*, du fait qu'elles se retrouvent en concentration insuffisante dans le cerveau, hautement protégé par une structure appelée la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Différents anticancéreux ont été testés sur lignée cellulaire issue d'un patient atteint de DIPG, et il apparaît que certains agents de chimiothérapie sont actifs. Cependant, ces molécules (comme beaucoup d'autres traitements) ne diffusent pas suffisamment dans le cerveau du fait de l'étanchéité de la BHE.

Nous développons des thérapeutiques vectorisées à partir de modifications chimiques de composés actifs *in vitro* pour optimiser l'accès à la tumeur. Cette vectorisation ciblée doit permettre une meilleure pénétration et distribution dans le cerveau par le biais d'un ciblage de protéines spécifiques présent à la BHE.

Nous évaluons les meilleurs candidats prédits à l'aide d'une méthode informatique (approche dite *in silico*) validée associée à une batterie de tests sur des lignées cellulaires *in vitro*.

Cependant une évaluation animale est indispensable avant d'envisager des études cliniques.

Les meilleurs candidats seront administrés chez l'animal pour permettre l'évaluation de la diffusion tissulaire et le calcul des paramètres pharmacocinétiques. Notre objectif est de pouvoir déterminer *in vivo* les paramètres pharmacocinétiques de trois candidats chimiques optimisés afin d'évaluer les fonctions de transport de nos candidats vectorisés optimisés. Des souris seront utilisées dans cette étude. Le nombre d'animaux estimé est de 640.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. La souffrance et l'angoisse infligées aux animaux seront limitées au maximum, une surveillance journalière sera mise en place et des points limites adaptés ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Les procédures se dérouleront sous anesthésie générale avec des analgésiques en cas de souffrance.

L'identification de traitements traversant efficacement la BHE devrait avoir un impact significatif comme futures alternatives thérapeutiques pour le DIPG.

16430 Les pathologies vestibulaires se caractérisent par des épisodes imprévisibles et souvent récurrents de vertiges, associés à des déséquilibres posturaux, au repos ou lors de déplacements. Ces atteintes sont souvent accompagnées d'étourdissements et de nausées, ainsi que des difficultés à stabiliser le regard lors de mouvements de la tête. Cet ensemble de symptômes impacte considérablement la vie quotidienne des patients. En France, le vertige constitue le 3^e motif de consultation chez le généraliste et représente 5% des urgences hospitalières. Différents modèles animaux ont été développés depuis plusieurs décennies afin de reproduire les symptômes de la pathologie vestibulaire rencontrés chez l'homme. Ces modèles permettent entre autres d'étudier les mécanismes neurobiologiques sous-jacents au syndrome vestibulaire et à sa compensation, et de tester de nouvelles solutions thérapeutiques via des approches pharmacologiques ou rééducationnelles. Les études en préclinique de nouveaux composés sont rendues difficiles par le manque de systèmes d'analyse suffisamment

sensibles pour rendre compte des différents aspects de la pathologie et surtout, des effets thérapeutiques potentiels.

L'objectif de ce travail est de concevoir de nouveaux paramètres permettant de quantifier objectivement le déficit vestibulaire et sa compensation puis d'impacter sur le décours temporel de la compensation vestibulaire par la pharmacologie et la rééducation.

Le modèle de neurectomie vestibulaire unilatérale (NVU) développé chez le rongeur consiste à sectionner chirurgicalement le nerf vestibulaire en provenance de l'oreille interne. Ce modèle reproduit le syndrome vestibulaire observé chez l'homme (mêmes altérations posturales, locomotrices et oculomotrices et cognitives). L'intérêt réside dans la durée de la compensation, beaucoup plus réduite chez le rat (2 à 3 semaines chez le rat, 90 jours chez l'homme). Ce gain temporel est avantageux pour l'étude de composés anti vertigineux et pour la compréhension des mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent le syndrome. Le manque de connaissances actuelles sur le syndrome vestibulaire ne nous permet pas encore de transposer les études sur des modèles de type *in silico*. Durant la procédure de NVU, les animaux seront couverts par une analgésie appropriée (injection sous-cutanée de buprénorphine) et anesthésiés à l'aide d'une anesthésie gazeuse à l'isoflurane. La respiration ainsi que la température de l'animal sont contrôlées pendant toute la chirurgie. Avant le réveil des animaux, une injection sous-cutanée d'une solution de Ringer Lactate est réalisée afin d'assurer une hydratation post-opératoire suffisante de l'animal. Durant la phase aiguë du syndrome vestibulaire (3 jours qui suivent la lésion), les animaux peuvent tourner sur eux-mêmes (comportement réflexe dû à la lésion), et donc blesser leurs congénères ou se blesser avec un enrichissement trop dense. Les animaux seront donc hébergés individuellement et avec un enrichissement adapté durant cette période. Les animaux sont alors observés quotidiennement par un des porteurs du projet ainsi que les zootechniciens. Après ces 3 jours les animaux sont de nouveau placés avec un congénère. Le nombre d'animaux a été fixé et adapté pour assurer une validation statistique des résultats.

Ainsi, durant la première partie de ce projet, une formation est prévue pour apprendre la NVU et s'entraîner à la chirurgie (les rats correctement lésés formeront le 1er groupe de l'étude (groupe contrôle lésé), principe de réduction). Suite à la NVU, un déséquilibre d'activité électrique entre les noyaux vestibulaires du tronc cérébral est à l'origine du syndrome vestibulaire. Au cours du temps, ce déséquilibre s'estompe. Ce phénomène est corrélé avec la disparition quasi-totale du syndrome vestibulaire et est considéré dans la littérature comme étant le paramètre clef de la restauration fonctionnelle. Le projet proposé s'intéresse aux biomarqueurs de cette restauration fonctionnelle.

L'utilisation d'un dispositif de répartition pondérale permettra, dans une première partie, d'identifier de nouveaux paramètres comportementaux chez le modèle NVU. Pour cela, 105 rats seront utilisés au cours de ce projet. Les résultats obtenus chez un groupe de rats contrôles non lésés seront comparés à un groupe de rats soumis à une perte vestibulaire (groupe contrôle lésé). L'utilisation du dispositif de distribution pondérale permettra d'évaluer les conséquences de la NVU chez l'animal libre de ses mouvements, en l'absence de toute contrainte ou restriction, afin de limiter un éventuel stress induit par l'évaluation comportementale du syndrome vestibulaire.

Dans une deuxième partie, afin de tester la sensibilité de ces nouveaux paramètres vestibulaires, des tests pharmacologiques utilisant différents composés anti vertigineux de référence seront réalisés. L'impact de ce type de composés sur les paramètres quantifiés permettra de confirmer ou d'infirmer la sensibilité de ces nouvelles mesures et ainsi de pouvoir les optimiser si nécessaire.

Dans une dernière partie, à l'instar de la pharmacologie anti-vertigineuse, des méthodes de rééducation sensori-motrice (simple versus complexe) seront utilisées chez les animaux vestibulo-lésés afin d'analyser leur impact sur la cinétique de récupération de la fonction posturale et locomotrice.

Le projet proposé s'intéresse également à la mise en évidence des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la compensation vestibulaire en condition physiologique mais également après rééducation physique et pharmacologique. Cette partie sera réalisée par une approche immunohistochimique utilisant des marqueurs spécifiques de la plasticité neuronale.

Tous les animaux de ce projet sont soumis à la règle des 3R.

Remplacement : Le recours aux modèles animaux est, pour l'instant, nécessaire pour vérifier d'un point de vue cellulaire les bénéfices comportementaux de la rééducation physique et pharmacologique

utilisés dans ce projet. Par ailleurs, l'étude de la cinétique d'expression des mécanismes cellulaires de neuroplasticité dans les noyaux vestibulaires déafférentés est un processus biologique dont l'exploration ne peut se faire que chez un modèle biologique vivant.

Réduction : Les rats correctement lésés durant l'apprentissage seront transférés vers le groupe contrôle lésé. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum pour chaque groupe en fonction de l'expérience précédente de l'équipe et avec l'aide d'un statisticien.

Raffinement : La souffrance des animaux est limitée au maximum. Une grille de score adaptée est utilisée pour évaluer le bien-être animal. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie sont adaptés pour les différentes procédures du projet. L'hébergement des animaux est adapté durant les premiers jours post-lésionnels pour garantir le bien-être animal et, les co-porteurs du projet sont formés en expérimentation animale (niveau concepteur de projet), en chirurgie sur rongeurs et sensibilisés au bien-être animal.

En conclusion, les résultats issus de ce travail permettront de mieux caractériser les symptômes posturaux et locomoteurs résultant d'une atteinte vestibulaire. Ces données, transposables à l'homme, permettront une meilleure prise en charge du patient vestibulaire.

16431 Nos travaux reposent sur l'hypothèse que la calréticuline (CALR) mutante sécrétée par les cellules tumorales a de puissants effets immunosuppresseurs. Nous avons prouvé que la CALR soluble inhibe la phagocytose des cellules dendritique *in vitro*, ce qui est un élément important pour les réponses immunitaires antitumorales induites par la chimiothérapie. Sur la base de nos données *in vitro*, ce projet est conçu pour étudier si une CALR soluble pourrait nuire à la réponse immunitaire anticancéreuse *in vivo*. Pour préparer ce projet, nous avons utilisé le système CRISPR / Cas9 pour effectuer une délétion ou une insertion du gène de la Calr dans différentes lignées cellulaires tumorales murines. L'objectif de ce projet est de déterminer si les tumeurs portant ces mutations répondent encore aux chimiothérapies ou immunothérapies immunogènes. Récemment, il a été démontré que les cellules myéloïdes suppressives jouent une régulation négative dans les immunothérapies. Notre deuxième objectif est de caractériser le ratio des cellules myéloïdes suppressives chez des souris porteuses de tumeurs présentant la Calr normal ou mutante. Les procédures expérimentales conçues répondront aux exigences de remplacement, de réduction et d'affinement. Le projet visant à étudier la réponse immunitaire antitumorale, elle ne peut être réalisée qu'*in vivo*, car il n'existe aucun modèle alternatif pour imiter la réponse immunitaire antitumorale aux chimiothérapies. Nous avons choisi le modèle de la souris car notre projet s'applique à révéler l'impact négatif des mutations de la Calr dans les traitements modernes du cancer chez les mammifères. Le système immunitaire de la souris est très similaire à celui de l'homme. Ce projet, d'une durée pouvant aller jusqu'à 3 ans, impliquera l'utilisation de 870 souris immunocompétentes, soit le nombre maximal que nous prévoyons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales ne concordent pas avec notre hypothèse de travail, réduisant ainsi l'utilisation de souris. Pendant toutes les expériences conçues, les animaux seront logés dans le respect de leur bien-être (maximum 5 souris par cage, avec des maisons en coton ou en papier pour améliorer l'environnement). Tous les animaux seront acclimatés au moins une semaine avant le début de l'expérience. Au cours du projet, les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Des paramètres de surveillance stricte seront définis pour minimiser le stress et / ou la douleur au cours de l'expérience. Toutes les personnes impliquées dans ce projet sont techniquement qualifiées et formées en continu aux pratiques. Une veille scientifique continue sera menée pour exclure toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Afin de tirer le meilleur parti de ces animaux, plusieurs tissus seront collectés pour extraire le maximum de données de chaque expérience et seront partagés avec nos collaborateurs afin de réduire l'utilisation future des animaux.

16432 L'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (HTP-TEC) est une maladie cardio-pulmonaire sévère qui aboutit à une hypertrophie cardiaque droite puis à une insuffisance cardiaque. L'HTPC est due à une obstruction des grosses artères pulmonaires suite à la mauvaise résolution d'un caillot de sang (embolie pulmonaire). L'embolie pulmonaire est une maladie fréquente. Chez 1 à 3% des survivants, la persistance d'une obstruction artérielle pulmonaire cicatricielle associée à des anomalies des petits vaisseaux pulmonaires peut conduire à une HTP-TEC. La plupart du temps,

L'HTPC se soigne bien, avec un acte chirurgical qui vise à retirer mécaniquement le matériel qui obstrue les vaisseaux bouchés. Cependant, dans certain cas, l'augmentation du flux sanguin dans les territoires non obstrués conduit à une altération des petits vaisseaux pulmonaires distaux non débouchables par la chirurgie. Dans ce cas, on envisage de traiter ces patients avec des médicaments spécifiques d'une autre classe d'hypertension pulmonaire : l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Ces molécules sont principalement des vasodilatateurs.

Le modèle le plus pertinent d'HTP-TEC actuel est un modèle d'embolisation pulmonaire par de la colle biologique chez le cochon. Ce modèle de gros animal est difficilement reproductible par des équipes non expertes et ne permet pas de tester à grandes échelles les traitements de l'HTAP qui sont excessivement onéreux.

Nous envisageons donc de créer un modèle d'HTP-TEC chez le rat par ligature de l'artère pulmonaire droite qui mimera une embolie pulmonaire droite (occlusion de l'artère) et qui redirigera l'ensemble du flux sanguin vers le poumon gauche. Si nous réussissons à créer ce modèle, augmentation de la pression artérielle pulmonaire et obstruction des petites artères pulmonaires dans le poumon gauche, nous testerons les thérapeutiques actuelles de l'HTAP dans ce modèle (3 médicaments différents). Si nous n'y parvenons pas, nous arrêterons le protocole au stade du développement du modèle.

Un nouveau modèle facile à réaliser chez le rat permettra de mieux comprendre comment se met en place les lésions distales d'HTP-TEC et comment soigner cette pathologie grâce notamment à des médicaments initialement développés pour l'HTAP. En effet, les patients deviennent symptomatiques (essoufflement à l'effort) et ne sont diagnostiqués que dans les stades terminaux de la maladie. Il n'est donc pas possible de disséquer l'histoire naturelle du développement des lésions pulmonaires chez l'homme. C'est pour cette raison que nous travaillerons avec un modèle animal de cette maladie finalement assez fréquente mais mal comprise et mal traitée en dehors du traitement chirurgical. Une combinaison des facteurs hémodynamique, nerveux et inflammatoires, et qui implique plusieurs types cellulaires différents, est impliquée dans l'apparition de l'HTP-TEC. Cette combinaison très difficile voire impossible à recréer *in vitro* et nécessite l'utilisation d'un modèle *in vivo* chez le rat, bon modèle de maladie cardiovasculaire.

Développer un modèle d'HTP-TEC chez le petit animal est donc un enjeu majeur pour s'assurer de l'efficacité et de la sécurité des traitements donnés aux malades et augmenter leur survie. En effet, il n'est pas exclu que les médicaments de l'HTAP puissent avoir des effets indésirables graves dans une autre forme d'hypertension pulmonaire.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées au cours du temps par des méthodes non invasives comme l'échocardiographie, permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation après un dernier bilan (cathétérisme) de leur fonction cardiaque, 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. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. 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. Le nombre total de rats utilisés sera de 105 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal.

L'HTP-TEC est une cause de handicap, d'insuffisance cardiaque et de mort prématurée en l'absence de traitement. Cette maladie vasculaire pulmonaire grave est un enjeu majeur du fait de la méconnaissance de cette complication d'une maladie fréquente, conduisant à des diagnostics tardifs et au risque de décès. L'ambition de ce projet est donc d'améliorer la prise en charge de ces malades

16433 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, mais aussi prévenir ces effets indésirables, afin d'améliorer la qualité de vie des patients. Des études longitudinales menées chez des patients atteints d'un cancer décrivent des performances cognitives altérées avant le début des traitements que la moyenne d'une population sans cancer du même âge, justifiant l'émergence du concept de « Cancerfog ». Cette atteinte cognitive n'a pas de lien de corrélation avec l'état émotionnel du patient (anxiété/dépression), l'anesthésie ou le type de chirurgie pratiqué. De même, des études sur des modèles animaux montrent que des souris xénotransplantées avec des cellules cancéreuses humaines présentent un comportement de type dépressif, ainsi qu'une altération de la mémoire. L'ensemble de ces données suggèrent l'implication directe du cancer dans la survenue de ces déficits émotionnels et cognitifs. Plusieurs études cliniques se sont alors intéressées aux facteurs plasmatiques circulant qui pouvaient être impliqués, mais aucun marqueur ne fait consensus. Cependant une étude a montré que l'injection de plasma de souris jeunes chez des souris âgées, entraîne une amélioration des performances de mémoire chez des souris âgées, suggérant le rôle majeur de facteurs plasmatiques circulant sur la mémoire. Notre travail pose donc l'hypothèse que des facteurs plasmatiques libérés par la tumeur, tels que des petites vésicules membranaires appelés exosomes, déjà connus dans la littérature pour préparer des niches métastatiques cérébrales, peuvent venir impacter les fonctions émotionnelles et cognitives chez la souris. Nous proposons de développer un modèle animal pour évaluer les potentiels effets délétères de tumeurs mammaires ou d'exosomes libérés par ces tumeurs, d'origine humaine ou murine, 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, la motivation et l'attention. Les cerveaux et plasmas seront prélevés pour comprendre les modifications neurobiologiques, et pour analyser les niveaux de cytokines, de corticostérone, et permettre la détection et la localisation des exosomes tumoraux dans l'organisme murin. Pour cela, un lot de souris, immunodéprimées ou immunocompétentes, auront des xénotransplants de cellules cancéreuses mammaires, humaines ou murines, dont l'expression d'une protéine ou d'un micro-ARN d'intérêt exosomal sera supprimée. Le plasma d'une partie de ces animaux servira à l'extraction des exosomes circulants afin de les caractériser et les injecter par voie intraveineuse chez des souris non porteuses de tumeur. De la même manière que les souris porteuses de tumeurs, ces souris recevant les injections d'exosomes, issus du plasma des souris cancéreuses ou issus de culture cellulaire, seront employées pour évaluer les effets comportementaux et biologiques du cancer et des exosomes tumoraux. Les tests comportementaux 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. Durant 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 autre lot d'animaux recevra une unique injection intracardiaque d'exosomes tumoraux marqués issus de la culture cellulaire uniquement. Cette diffusion systémique aura pour but d'évaluer la distribution des exosomes tumoraux au niveau cérébral et leurs effets physiologiques à court terme. Un total de 3300 souris sera nécessaire pour l'étude, incorporant des souris immunocompétentes et immunodéprimées, porteuses de tumeurs ou recevant des injections intraveineuses/intracardiaques d'exosomes tumoraux issus de deux lignées cancéreuses humaines et de deux lignées cancéreuses murines. Les quatre lignées cancéreuses auront l'expression d'une protéine exosomale ou d'un micro-ARN réprimée dans une volonté d'endiguer l'impact délétère des exosomes tumoraux. Ces différents modèles animaux serviront à comprendre et évaluer l'impact du cancer et des exosomes tumoraux sur les aspects émotionnels et cognitifs, ainsi qu'à l'étude de la biodistribution exosomale. En conséquence, cette étude ne peut être réalisée qu'en condition in-vivo

chez le modèle rongeur. Durant toute la durée de l'expérimentation, la règle des 3R sera respectée. Les souris seront habituées aux conditions d'hébergement pendant les 2 semaines qui suivent leur livraison et 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. 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.

16434 Le porc est une espèce polytoque et les porcelets naissent nombreux et relativement immatures. La période postnatale est donc une période critique pour le développement et la santé du porcelet et qui conditionne sa capacité à s'adapter au sevrage, autre période critique dans les élevages de porcs où les animaux sont sevrés jeunes entre l'âge de 3 et 4 semaines. Durant ces périodes, des substances médicamenteuses comme des anti-infectieux sont encore utilisées et ce malgré des efforts substantiels de la filière porcine pour en réduire l'utilisation. Depuis plusieurs années, la recherche d'alternatives aux traitements anti-infectieux a mobilisé les différents acteurs de la filière afin de répondre à l'enjeu du plan Ecoantibio 2017 prévoyant une réduction de l'utilisation des anti-infectieux de 25%. Parmi ces alternatives figurent les solutions préventives visant à favoriser le développement et la maturité du porcelet le plus précocement possible en intervenant sur l'alimentation de la truie. Ces solutions visent à agir sur la santé et l'équilibre de la truie qui transmettra un lait et/ou un microbiote donnant aux porcelets une protection jusqu'au sevrage et au-delà.

L'objectif de ce projet est de déterminer si l'apport, aux truies et aux porcelets, d'extraits végétaux et d'huiles essentielles choisis pour leurs activités immunostimulante, anti-inflammatoire et antibactérienne modifie la qualité immune et nutritive du lait de la truie ainsi que le microbiote digestif, le statut immunitaire et inflammatoire des truies et des porcelets et, in fine, peut contribuer à préserver la santé des porcelets pendant la phase de lactation et au sevrage. Cet essai inclura au maximum 64 truies et leurs portées (environ 14 porcelets par portée) soit un total de 960 porcs. Les truies seront réparties en 2 lots expérimentaux de 32 truies maximum : Témoin et Traitement (apport d'extraits végétaux et d'huiles essentielles pendant la fin de la gestation et la période de lactation). Les portées des truies Témoin et Traitement seront subdivisées en 2 lots expérimentaux correspondant à des portées Témoin et des portées Traitement (apport ponctuel d'huiles essentielles 3 jours après la naissance). Ce dispositif permettra d'identifier les effets transmis par la mère (portées issues des truies Traitement) de ceux induits par le traitement des porcelets uniquement (portées issues des truies Témoin). Les porcelets seront sevrés à l'âge de 4 semaines et les observations poursuivies jusqu'à 1 semaine après le sevrage. Les performances (pesées régulières) et la santé des truies et des porcelets seront enregistrées tout au long de l'essai. Des prélèvements de fèces seront effectués sur les truies et 3 porcelets représentatifs par portée pour étudier le transfert du microbiote de la mère aux porcelets. Des prélèvements de colostrum et de lait seront effectués sur les truies pour en établir la composition nutritionnelle et en immunoglobulines. Enfin, un nombre limité de prises de sang seront réalisées sur les truies (3 prises de sang en début de gestation et de lactation, et au sevrage des porcelets) et sur 4 porcelets par portée (2 porcelets prélevés à l'âge de 2 jours et 14 jours, puis 2 autres porcelets prélevés et 1 semaine après le sevrage pour la mesure d'indicateurs du statut métabolique et d'immunité. La règle des 3 R sera respectée. Réduction : le nombre de truies et de portées est suffisant pour mettre en évidence un effet du traitement. Le nombre de porcelets soumis aux prises de sang ainsi que le nombre de prises de sang par porcelet et par truie sont limités et suffisants pour répondre aux questions scientifiques posées. L'ensemble des procédures sera réalisé par du personnel expérimenté et en respectant des points limites afin de réduire la souffrance et la douleur des animaux. Remplacement : l'approche envisagée prévoit d'étudier le rôle d'ingrédients fonctionnels sur la santé des porcelets et des truies ne peut être réalisée que sur des animaux vivants dans des conditions expérimentales contrôlées.

16435 Notre bureau d'études spécialisé dans les suivis piscicoles en rivières et offre une gamme de services et d'outils permettant de concilier les activités humaines avec les exigences légales en termes de protection de l'environnement. Nous nous appuyons sur une expertise scientifique qualifiée, construite et cultivée avant tout sur le terrain.

Notre activité de service conseil offre un accompagnement des projets industriels et des projets de restauration environnementale. Nous avons développé une expertise en suivi de la faune piscicole, autant pour des aspects démographiques que comportementaux. Actuellement, des Directives Européennes imposent aux états membres de l'UE des objectifs ambitieux en termes de restauration de la continuité écologique. Il s'agit concrètement d'aménager les rivières pour permettre aux poissons de franchir les ouvrages à la montée comme à la descente. Dans ce cadre, nous proposons notre expertise et des outils particulièrement innovants pour valider l'efficacité et l'attractivité des échelles à poissons construites en nombre ces dernières années.

La télémétrie adaptée au suivi piscicole est un outil maîtrisé et utilisé par nos biologistes. Le but est de suivre individuellement les déplacements des poissons préalablement marqués. Ainsi, il est notamment possible d'étudier l'efficacité des échelles à poissons, la fréquentation d'habitats récemment restaurés (frayère, zone de repos, etc.) ou encore le comportement à proximité d'un barrage. Des antennes couplées à des récepteurs sont placées sur les sites d'étude afin d'enregistrer en continu les mouvements des poissons.

Nos activités demandent donc de réaliser des marquages de poissons et d'effectuer des actes chirurgicaux sous anesthésie. Le nombre total maximal de poissons entrant dans le projet est 1000 par année, soit 5000 poissons sur une durée de 5ans. C'est pourquoi, nous réalisons aujourd'hui cette demande d'autorisation de projet.

Règle des 3R :

Remplacement : nous intervenons sur les espèces pour lesquelles nos clients ont identifié un besoin de connaissances. L'objectif des études est d'augmenter les connaissances sur le comportement d'espèces sauvages cibles au voisinage d'ouvrage hydraulique. Le remplacement par d'autres espèces ou l'utilisation de modèle n'est dans ce contexte pas envisageable. Au contraire les données acquises servent à alimenter des modèles.

Réduction : Pour ces études, nous choisissons de limiter au maximum le nombre d'individus à équiper mais un minimum de 30 individus par espèce est requis pour des questions de robustesse des analyses statistiques.

Raffinement : Les poissons sont maintenus dans des conditions de stabulation appropriées (grand volume d'eau, aération permanente, abris, etc.). Les opérations d'implantation d'émetteurs sont réalisées rapidement (1 à 3 min) sous anesthésie. Les individus sont replacés dans leur milieu naturel dès qu'ils ont retrouvé un comportement normal en quelques heures

16436 La protéine AGR2, résidente du réticulum endoplasmique, est fortement surexprimée dans les adénocarcinomes humains et joue un rôle important dans l'agressivité du cancer et dans résistance aux thérapies. De plus, cette protéine est sécrétée et détectée dans les fluides extracellulaires, des patients atteints d'adénocarcinome. Dans ce projet, nous proposons de décrire le rôle de l'AGR2 dans la progression des adénocarcinomes du sein et du poumon. Les résultats obtenus grâce à ce projet devraient indiquer les mécanismes permettant à la protéine AGR2 de contrôler la progression de ces 2 types d'adénocarcinome. La compréhension des mécanismes moléculaires d'AGR2 fournira la base d'études supplémentaires pour d'autres types d'adénocarcinome et pointera vers de nouvelles cibles thérapeutiques potentiellement pertinentes.

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunodéprimé afin d'y implanter des cellules tumorales humaines. 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. De notre côté, nous nous attachons à bien définir le projet et sa pertinence comme le stipule la règle des 3R. En effet, avant de réaliser les procédures, des études préliminaires ont été réalisées afin de remplacer chaque fois que cela est possible le modèle *in vivo* par des modèles *in vitro*. A ce stade du projet, l'utilisation de modèles animaux reste inévitable

puisqu'aucun modèle suffisamment précis n'est disponible pour étudier ces processus. Ces études *in vivo* et l'intérêt d'avoir un modèle, orthotopique et reproductible pour bien appréhender l'efficacité de nouvelles molécules et ce, dans le même environnement. Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochables. Au total 336 souris au maximum seront nécessaires pour cette étude. Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'ils pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté. Pour cela des soins pré-, per- et postopératoires adéquats seront réalisés. Toutes les interventions sont réalisées sous anesthésie générale et des traitements analgésiques sont systématiquement utilisés pour prévenir toute douleur.

16437 Les infestations du tractus gastro-intestinal par les nématodes constituent une menace majeure pour la production, la santé et le bien-être des herbivores domestiques. Chez les chevaux, les strongles (en particulier les cyathostomes qui sont majoritaires) sont les plus problématiques car ils affectent la croissance des individus et peuvent entraîner leur mort lors de l'émergence massive de stades larvaires enkystés dans la muqueuse caeco-colique. Le contrôle indispensable de ces parasites repose classiquement sur un emploi massif d'anthelminthiques chimiques. Toutefois, les rapports d'une diminution de leur efficacité abondent aujourd'hui à l'échelle mondiale et les lactones macrocycliques ont des répercussions environnementales significatives. La recherche de solutions alternatives est donc nécessaire et l'efficacité de plantes « bioactives », dont les métabolites secondaires ont montré des effets antiparasitaires chez les ruminants, commence à être évaluée sur les strongles des équins. Dans une étude récente, des poulains alimentés pendant une cure de 18j avec des granulés de sainfoin (légumineuse riche en tannins condensés) excrétaient autant d'œufs de strongles par gramme de fèces (OPG) que des poulains témoins nourris avec un régime iso-énergétique et iso-protéique. Toutefois, un effet d'inhibition des métabolites secondaires du sainfoin sur le développement des œufs en larves infestantes a été démontré *in vitro* à partir de solutions de granulés de sainfoin mises en présence de fèces de chevaux infestés. L'objectif de notre essai est donc de tester si une cure de granulés de sainfoin dans l'alimentation des chevaux est efficace pour limiter le développement des œufs de strongles en larves et permet d'envisager de réduire leur contamination au pâturage. Des essais *in vivo* sont en effet indispensables pour vérifier l'efficacité des granulés chez l'animal et préciser leurs conditions d'utilisation dans le cadre des pratiques d'élevage. Deux régimes alimentaires seront testés sur deux lots de 10 poulains de selle de 2 ans, classe d'âge particulièrement sensible au parasitisme. Les poulains seront modérément infestés au début de l'essai car ils auront été vermifugés à l'Ivermectine 4 mois plus tôt. Un régime « sainfoin », composé de granulés de sainfoin et de paille de blé. La proportion de granulés visera une teneur en tannins condensés dans la ration de 3 à 5%MS (proportion ayant montré des effets anthelminthiques chez les ruminants) et respectera une couverture des besoins énergétiques et protéiques de 100% et 230% maximum respectivement. Il a été montré que ce taux de couverture des besoins protéiques était sans risque pour la santé des poulains sur la durée de la cure. L'utilisation de granulés de sainfoin nous permettra de garantir une teneur en tannins condensés stable du régime. Un régime « témoin, composé de paille de blé, de granulés de ray-grass italien et de plaquettes de tourteau de lin pour être iso-énergétique et iso-protéique avec le régime « sainfoin ». Les 20 poulains, préalablement conduits ensemble à l'herbe, seront rentrés en stabulation collective et nourris avec un régime de transition pendant 15j. A l'issue de cette période, ils seront répartis de manière équilibrée entre les deux lots sur la base de leur niveau d'OPG, poids vif, race et sexe. Il a été montré que des lots de 10 individus offraient une puissance statistique de 80% pour détecter des pourcentages de réduction de l'éclosion d'œufs en larves de l'ordre de 20 %. Une semaine d'adaptation aux régimes « sainfoin » et « témoin » sera réalisée en boxes individuels, puis les chevaux seront nourris avec leurs régimes expérimentaux pendant 18j. Cette durée de cure a montré des effets positifs chez les ruminants et est adaptée à une utilisation pratique. Le logement en box individuel, classiquement utilisé en élevage et indispensable pour contrôler l'alimentation individuelle des poulains, sera ainsi réduit à sa durée minimale et les boxes permettront des interactions visuelles et physiques entre individus. Pendant la cure, les quantités d'aliments offertes seront ajustées chaque semaine en fonction du changement de poids vif des individus. Si un animal refuse plus de 5% de sa ration pendant 3j consécutifs, sa ration sera réduite de 5% ainsi que celle d'un poulain de l'autre lot

pour respecter les équilibres énergétiques et protéiques. Les quantités initiales seront restaurées dès que les deux animaux refuseront moins de 5% de leur ration sur 3j consécutifs.

Les mesures sur les animaux concerneront : Les quantités ingérées journalières des aliments par la pesée quotidienne des quantités offertes (matin et soir) et refusées (matin) au cours des 18j. Les pesées hebdomadaires des animaux (six pesées au total) pour équilibrer les lots expérimentaux et ajuster les quantités d'aliments offertes. Les prélèvements fécaux par voie transrectale à l'aide d'un gant d'examen lubrifié (200g de fèces frais et non contaminés) : (i) à la rentrée en bâtiments pour la mise en lots à partir des mesures d'OPG, (ii) le premier jour de la période d'adaptation pour déterminer les taux individuels de développement des œufs en larves avant la mise en place des régimes, (iii) à 4 reprises au cours des 18j de cure pour analyser les effets des deux régimes alimentaires. Cette cinétique permettra d'établir la durée minimale de cure pour observer les effets escomptés, de l'ordre de 80% de réduction du taux de développement des œufs en larves. Les animaux seront vermifugés à l'ivermectine à l'issue de l'expérimentation et un dernier prélèvement sera réalisé 10j après le traitement pour vérifier son efficacité (95% de réduction d'OPG).

Les manipulations seront réalisées par des personnes expérimentées et familières des animaux. L'état des animaux et leur comportement seront surveillés quotidiennement. Un individu sera vermifugé et exclu de l'essai dans les cas suivants : refus de s'alimenter pendant plus d'une journée, perte de poids supérieure à 10%, OPG supérieur à 3 000, dégradation d'état général (coliques, diarrhées, anorexie).

16438 Le projet : Les cancers primitifs du foie (carcinome hépatocellulaire et cholangiocarcinome) représentent 7000 et 2000 nouveaux cas par an en France. Ce sont deux tumeurs de très mauvais pronostic. Les traitements curatifs (ablation de la tumeur, transplantation du foie) ne peuvent être proposés qu'à un nombre restreint de patients (40%).

Cependant, l'efficacité des traitements curatifs est grevée par la récurrence tumorale liée à la dissémination métastatique ou à l'émergence d'une nouvelle tumeur si le foie malade cirrhotique est laissé en place. Il n'existe pas de traitement de prévention de la récurrence. Les patients ayant un CHC non opérable bénéficient depuis 2008 d'un traitement systémique palliatif, le sorafenib, mais son efficacité est limitée et l'émergence de résistances est rapidement objectivée. Aucun traitement palliatif montrant un bénéfice sur la survie ne peut être proposé aux patients ayant un cholangiocarcinome non opérable.

Dans ce contexte, la recherche que nous menons a pour objectif de caractériser et quantifier l'activité de nouvelles thérapies (médicaments, traitement physique) pour le traitement des tumeurs hépatiques. La preuve d'activité/efficacité anti-tumorale des nouvelles thérapies sera faite au préalable *in vitro* sur des lignées humaines de carcinome hépatocellulaire ou de cholangiocarcinome. Des évaluations seront ensuite conduites *in vivo* dans le modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules de cancer hépatique chez la souris immunodéprimée (demande déjà autorisée). Cependant, certaines thérapies pourraient s'avérer aussi efficaces pour limiter la dissémination métastatique et le modèle de xénogreffe sous-cutanée ne permet d'étudier cet aspect.

Aussi, nous souhaitons pour nos études développer un modèle de xénogreffe orthotopique dans le foie chez la souris immunodéprimée. L'utilisation d'un modèle murin de xénogreffe orthotopique de cellules cancéreuses du foie se justifie à double titre : tout d'abord, il permet de recréer au plus près l'environnement dans lequel prolifèrent les cellules tumorales. Deuxièmement, il permet d'analyser la capacité des cellules tumorales à métastaser et permet donc d'étudier l'efficacité des thérapies sur la dissémination métastatique. Ce modèle est plus « lourd » d'un point de vue chirurgical que le modèle de greffe en sous-cutanée et sera donc utilisé sur un nombre beaucoup plus restreint d'animaux.

Dans ce modèle, nous étudierons les traitements pour lesquels nous aurons montré au préalable *in vitro* un effet sur les capacités proliférative/migratoires et invasives des cellules cancéreuses. Afin que le bien-être animal soit au mieux respecté, des critères précis d'interruption du protocole par euthanasie seront définis.

Les animaux :

* Type : Souris (*Mus musculus*) modèle de xénogreffe chez la souris immunodéficente.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 30 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 et le traitement des cancers du foie 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.

Nous mettrons en place une étude pilote réalisée sur des groupes de 5 individus afin de déterminer les conditions optimales du traitement qui sera ensuite appliqué sur les groupes expérimentaux constitués de 8 souris.

*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.).

16439 Le microbiote intestinal des enfants nouveaux nés, recevant une alimentation au lait maternel riche en lactose et oligosaccharides, est composé d'une importante population de bactéries productrices de lactate (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Bifidobacteria*, *Enterobactériaceae*). Le lactate produit ne s'accumule pas dans le côlon : il est rapidement réutilisé par la communauté des bactéries utilisatrices de lactate (LUB), composée d'espèces productrices de propionate (*Bacteroides* sp., *Cutibacterium* sp. et de *Veillonella* sp.), de butyrate (*Anaerostipes* sp., *Eubacterium hallii*, *Eubacterium limosum*), ou de sulfures (*Bilophila* sp et bactéries sulfato-réductrices (SRB). Les LUB productrices de propionate sont fortement abondantes chez les enfants jusqu'à l'âge de 4 mois alors que l'abondance des SRB et des bactéries productrices de butyrate augmente progressivement jusqu'à l'âge d'un an. L'implantation du microbiote intestinal, dès les premiers stades du développement, a un rôle majeur sur la santé de l'enfant. Ainsi, des dysbioses du microbiote ont été observées chez les enfants souffrant de diverses pathologies, dont la colique du nourrisson (Infant Colicky= IC) qui affecte 5 à 19% des enfants de moins de 5 mois. L'IC est caractérisée par des pleurs et des cris, de la nervosité/agitation ou encore de l'irritabilité, sans cause rationnelle et aujourd'hui encore, sans solution thérapeutique. Des déséquilibres du métabolisme microbien ont été récemment démontrés chez ces nourrissons atteints d'IC. A l'âge de 3 mois, les enfants IC sont majoritairement colonisés par une population de LUB productrice de gaz (H₂), à un niveau plus important que la population utilisatrice de ce composé, comparés aux enfants sains. Ce déséquilibre microbien engendre une sur-production colique de H₂ qui pourrait stimuler les espèces SRB et conduire une production accrue de leur métabolite délétère, H₂S. L'ensemble de ces perturbations du métabolisme microbien pourrait ainsi être à l'origine de l'inconfort digestif, de la douleur et des distensions abdominales constatés chez les enfants IC. Parallèlement, les espèces du genre *Cutibacterium*, qui s'implantent rapidement chez les nouveaux nés sains, sont capables de convertir le lactate en propionate, acétate et CO₂ sans production d'H₂. L'utilisation de ces espèces comme probiotique chez l'enfant présente ainsi un intérêt particulier pour métaboliser le lactate en propionate, au détriment des métabolites délétères comme H₂ et H₂S. Dans le cadre de l'IC, si les études cliniques ont permis de corrélérer l'existence d'une

dysbiose avec un état pathologique, il est nécessaire de pouvoir bénéficier de modèles d'étude *in vivo* pertinent pour comprendre plus précisément les aspects mécanistiques de cette relation. L'utilisation d'animaux modèles, et plus particulièrement de rongeurs associés à un microbiote de volontaire humain, ont été utilisés avec succès pour montrer l'impact du microbiote intestinal sur la santé de l'hôte. Dans le contexte de l'IC, l'utilisation de modèles de rongeurs axéniques associés à des microbiotes d'enfants allaités ont été envisagés et des études préliminaires réalisées mais ces modèles ne sont pas totalement validés.

Ainsi, l'objectif du projet est de développer et de valider un modèle animal permettant d'étudier le rôle du microbiote dans l'étiologie de l'IC. L'impact d'une supplémentation par un probiotique comme *Cutibacterium avidum* P279, sur le métabolisme et la composition du microbiote sera également recherché. Pour le respect de la règle des 3Rs, le nombre de chaque groupe d'animaux a été réduit au minimum nécessaire pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements, 120 animaux seront utilisés pour l'ensemble du projet et sur la durée de la demande d'autorisation en fonction du recrutement de volontaires sains et de 6 souffrant de coliques. De plus, une surveillance sera mise en place tout au long de l'expérimentation pour détecter, réduire ou soulager l'inconfort potentiel occasionné par l'implantation d'un microbiote provenant d'un enfant souffrant de colique.

16440 Les douleurs neuropathiques correspondent à un groupe hétérogène de douleurs résultant d'une lésion ou d'une maladie affectant le système nerveux. D'un point de vue clinique, elles sont caractérisées par des signes de douleur spontanée (continue ou intermittente) ou de douleur évoquée comme l'hyperalgie (augmentation de la douleur à une stimulation douloureuse) et l'allodynie (douleur à une stimulation non douloureuse) coexistant souvent avec de l'anxiété et des troubles cognitifs (mémoire). Les douleurs neuropathiques et les comorbidités associées sont particulièrement problématiques à cause de leur sévérité, de leur chronicité, de leur résistance aux analgésiques (antidouleurs) classiques et à cause de l'efficacité limitée des traitements de référence (antidépresseurs tricycliques). Parmi les antidépresseurs, les plus efficaces -les tricycliques- sont aussi les plus anciens, et associés à des effets indésirables sévères, tandis que des antidépresseurs plus récents et mieux tolérés, comme les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS), sont faiblement efficaces. Les données de la littérature indiquent cependant qu'en inhibant une voie de signalisation (dépendante de mTOR) du récepteur de la sérotonine de type 5-HT₆, il est possible de réduire les douleurs neuropathiques.

L'objectif principal de ce projet est d'étudier ce récepteur (5-HT₆) dans un contexte de douleur neuropathique en étudiant en particulier comment est régulé le mouvement de ce récepteur dans les neurones. Nous proposons d'évaluer le pouvoir antalgique (antidouleur) d'outils moléculaires capables de supprimer la voie mTOR des récepteurs 5-HT₆ spinaux, chez la souris. Pour ce projet, le recours à l'animal présentant une douleur neuropathique est indispensable ; son utilisation sera limitée dans le temps (15 j maximum) et interrompue si l'animal présente des signes d'inconfort ou de douleur perturbant son activité, suivant les procédures d'euthanasie appropriées. Une administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) en sous-cutanée sera effectuée avant et le jour suivant la chirurgie chez tous les animaux. Le comportement général de l'animal, son poids, son apparence, la présence d'eau et de nourriture dans chaque cage enrichie seront surveillés quotidiennement (7 j/7). L'effectif maximal calculé pour atteindre les objectifs est de 384 souris, il a été déterminé par la puissance des tests statistiques et la grandeur de la variation attendue. Le remplacement ne peut ici s'effectuer puisque la douleur ne peut être appréciée que dans un modèle vivant intégré. Notre projet respecte donc la règle des « 3R » autant que possible.

16441 L'obésité est aujourd'hui un problème majeur dans les pays dits développés. Nous avons récemment montré que les plaquettes sanguines de patients atteints d'obésité sévères sont plus difficilement activables et que cela pouvait être lié à la diminution de signalisation de calcium. Nous proposons que la diminution de l'expression de pompes à calcium dans les plaquettes observées dans l'obésité sévère est une adaptation permettant, en diminuant la sensibilité plaquettaire, de réduire les risques vasculaires (thrombose) qui sont plus importants chez ces patients en raison de l'augmentation dans la circulation sanguine d'éléments pouvant activer les thromboses. D'ailleurs, les patients suivis retrouvent un niveau de protéine et de sensibilité plaquettaire normaux après amaigrissement. Nous

avons aussi décrit cette voie de signalisation chez la souris grâce à l'utilisation d'animaux déficients pour cette protéine.

En parallèle, nous avons observé dans ce modèle murin que l'absence de cette protéine se traduit par une diminution de la prise de poids avec l'âge.

Nous proposons d'étudier si cette voie de signalisation peut avoir un effet sur la prise de poids et un rôle protecteur au niveau cardiovasculaire en soumettant ces animaux à un régime riche de type « high fat » pendant 10 semaines et en étudiant ensuite les fonctions plaquettaires et cardiaques.

L'utilisation de modèle murin est aujourd'hui indispensable car il n'est pas encore possible de pouvoir disposer de plaquettes sanguines produites *in vitro* pour réaliser ces études.

Afin de répondre à la règle des 3 Rs, les animaux sont élevés dans 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 la nidification), la souffrance sera limitée par le respect des méthodes anesthésiques et analgésique. L'ensemble des expériences seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux. Enfin le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude a été défini pour chaque procédure de façon à avoir une réponse statistiquement analysable tout en limitant le nombre d'animaux nécessaire par la réalisation de plusieurs procédures en parallèle quand cela est possible.

Ce projet utilisera 96 animaux.

16442 Un enjeu majeur pour les élevages de ruminants en France est de favoriser une transition vers des systèmes herbagers et peu dépendants d'intrants. Cette transition peut être facilitée par des sélections génétiques, notamment concernant l'efficacité alimentaire et la résistance au parasitisme. Le parasitisme est une des principales contraintes au pâturage. En particulier les nématodes (vers ronds) gastro-intestinaux sont ingérés en même temps que l'herbe et provoquent un affaiblissement général de l'animal, une plus grande susceptibilité aux maladies, une baisse de la production, et un coût supplémentaire pour l'éleveur (achat de vermifuge). Plutôt que d'utiliser des vermifuges, on a démontré la faisabilité de sélectionner des moutons résistants au parasitisme. Cette résistance est effective pendant le jeune âge mais on ignore encore comment elle s'exprime et dans quelles conditions (stade physiologique, conditions d'élevages). L'efficacité alimentaire représente quant à elle la capacité des animaux à transformer l'aliment ingéré en lait ou en viande tout en limitant les rejets polluants. Chez les ovins, cette efficacité peut être améliorée grâce à la sélection mais cette possibilité a été établie à partir de mesures chez des agneaux en phase de d'engraissement avec une alimentation riche. On ignore encore si une telle sélection permettra d'obtenir des animaux qui sont aussi plus efficaces à un âge plus avancé et en ingérant des rations plus pauvres à base de fourrages ou au pâturage.

Les objectifs du projet sont (i) de mieux caractériser les mécanismes de résistance au parasitisme qui ont été sélectionnés ainsi que leur expression pendant la croissance et pendant la vie adulte, (ii) mieux caractériser l'efficacité alimentaire dans le cas d'une alimentation principalement à base de fourrages, et (iii) quantifier les effets de la sélection des ovins sur la résistance au parasitisme sur leur efficacité alimentaire, et vice-versa (i.e. effets de la sélection des ovins sur l'efficacité alimentaire sur la résistance au parasitisme).

Pour ce projet, nous utiliserons 260 animaux sur 3 ans. Il s'agit de moutons issus de lignées divergentes pour la résistance au parasitisme gastro-intestinal (une lignée résistante R et une lignée sensible S) et d'autres issus de lignées divergentes pour l'efficacité alimentaire (une lignée hautement efficace RFI- et une lignée faiblement efficace RFI+). Chez les animaux R et S, nous utiliserons 1) des animaux adultes naïfs qui seront infestés expérimentalement afin mesurer leur résistance au parasitisme et sélectionner ainsi les plus divergents qui participeront à la création de la génération suivante (60 femelles et 20 mâles d'environ 10 mois), puis 2) des jeunes agneaux femelles (n = 90) pour répondre aux objectifs du projet. Chez les RFI+ et RFI- nous utiliseront seulement des jeunes agneaux femelles (n = 90).

Pour le protocole d'infestation expérimentale, nous utilisons *Hæmonchus Contortus* (le principal nématode pathogène très répandu en France). Ce protocole vise à mimer l'immunisation naturelle des jeunes animaux mis à l'herbe mais à partir d'une dose connue de larves infestantes. Dans chaque lot

de 90 agneaux femelles R/S et RFI+/-, 60 seront infestées (30 par lignée) et comparées aux 30 femelles témoins (15 par lignée) non-infestées pour étudier l'effet de l'infestation sur la croissance. Les agnelles R et S infestées serviront aussi à caractériser le développement interne des parasites, la réponse immunitaire, ainsi que les effets sur la composition corporelle. Parmi les femelles RFI- et RFI+, 48 seront à nouveau soumises au protocole d'infestation à l'âge adulte, autour de la première mise-bas. Un vermifuge sera administré dès que les mesures nécessaires auront été effectuées.

Les 90 agnelles RFI- et RFI+ seront évaluées individuellement pendant une première phase d'alimentation à base de concentrés à partir de 3 mois d'âge pendant 6 semaines puis en lot, tout d'abord en bâtiment où elles seront alimentées d'herbe coupée, puis au pâturage. A l'issue de chacune des phases de mesures d'ingestion (concentré, herbe coupée et pâturée), 3 types de prélèvements seront effectués (contenu ruminal pour la caractérisation du microbiote, prise de sang pour estimer les nutriments absorbés par l'animal et pour caractériser le génome de l'animal, collecte de fèces pour l'analyse par spectrométrie dans le proche infra-rouge).

Des mesures par imagerie (CT-scan et IRM) seront aussi effectuées dans un autre établissement utilisateur (EU) (saisine 23800) pour caractériser de façon non-invasive la composition en différents tissus et leurs dimensions (ex : taille du rumen). Cela concernera 18 femelles des lignées R et S (3 de chaque lignée caractérisées 7, 14, et 35 jours après infestation).

3 R :

- Remplacer : On ne peut pas remplacer l'hôte (le mouton) pour la réalisation du cycle parasitaire et l'étude de l'impact de la sélection pour la résistance aux parasites sur les autres fonctions biologiques de l'hôte. Les prélèvements de contenu ruminal pour caractériser le microbiote ruminal se font par intubation ponctuelle, en remplacement de la méthode qui consistait à poser des canules ruminales. Les données expérimentales serviront à la calibration d'un modèle mathématique. Ceci permettra d'utiliser la simulation numérique plutôt que l'expérimentation animale pour explorer les réponses sur une gamme plus large des conditions de milieu.

- Réduire : Le nombre d'animaux prévus dans l'expérimentation a été limité au maximum pour avoir un effectif garantissant l'interprétation des données.

- Raffiner : Les brebis et leurs agneaux sont hébergés sur une litière paillée et en lots de manière à pouvoir exprimer leurs comportements sociaux. Elles sont habituées à être manipulées et les prélèvements sont réalisés par du personnel expérimenté. Le milieu est enrichi de disques à mordiller suspendus.

16443 L'adénocarcinome pancréatique (ADKP) arrive en 4ème position des causes de décès par cancer en Europe et a vu son incidence doubler en 30 ans. Le taux de survie des patients ne dépasse pas 8% à 5 ans avec une médiane de survie de 4 à 6 mois après le diagnostic. Ce cancer est asymptomatique et lors de sa détection 80 à 90% des patients présentent des métastases au niveau du foie et des ganglions. La seule thérapie véritablement efficace de cette pathologie reste la chirurgie qui n'est applicable que chez 15% des patients lorsqu'il y a peu ou pas de métastases. Face au manque d'outils thérapeutiques efficaces pour ce cancer, nous proposons un ciblage métabolique de cette tumeur pour limiter les voies activées dans les cellules cancéreuses afin de les affaiblir et de bloquer leur croissance. En effet, l'une des caractéristiques principales du cancer du pancréas est qu'il possède un microenvironnement dense, composé de cellules autres que tumorales ou de réseaux de protéines, qui empêche la vascularisation de la tumeur et l'apport en nutriments aux cellules cancéreuses. La présence de ce microenvironnement favorise d'une part, la résistance de la tumeur aux chimiothérapies, et aussi le développement de cellules tumorales agressives qui s'adaptent pour survivre à ces conditions particulières et qui seraient responsables de l'apparition des métastases. Dans ce contexte, mon étude sera portée sur le rôle d'enzymes d'une voie métabolique, celle de la méthionine, que nous avons découverte comme activée particulièrement dans les cellules cancéreuses agressives et métastatiques. Ces protéines pourraient être des cibles thérapeutiques spécifiquement dans ces cellules agressives responsables des métastases. Cette approche thérapeutique innovante offrira de nouvelles perspectives pour le cancer du pancréas et, en combinaison avec les thérapies actuelles, permettra d'abolir la présence de métastases pour permettre aux patients de bénéficier de

la résection chirurgicale et ainsi augmenter leur moyenne de survie. Cette étude s'appuiera soit, sur la synthèse de nouvelles drogues ciblant ce métabolisme, soit via l'utilisation d'inhibiteurs préexistant qui auront été auparavant validé dans notre étude *in vitro*. Cela pourrait conduire à de nouveaux essais cliniques visant la régression tumorale et l'apparition des métastases de l'ADKP. Ces études seront réalisées sur différents modèles murins. Les deux premiers modèles murins PKI et KPC développent de façon spontanée des tumeurs primaires pancréatiques et/ou des métastases, et miment de façon très similaire la progression tumorale observée chez le patient. Les deux autres modèles KI et KC, sont des modèles murins qui ne développent pas de tumeurs et dans lesquels nous viendrons implantés par chirurgie différentes cellules tumorales.

Les expériences relatives à ces 4 modèles nécessitent d'être réalisées à partir de modèles murins d'ADKP induits ou spontanés reproduisant au mieux les caractéristiques de l'ADKP humain et présentant des mutations similaires. L'utilisation du modèle murin est indispensable à cette étude mais de nombreux tests *in vitro* seront réalisés auparavant afin de diminuer au maximum le nombre d'animaux nécessaires à ces expérimentations (remplacement). Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum requis pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs (réduction). Un enrichissement matériel (tunnel/maison en carton, coton/papier) 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, l'établissement du score de douleur sera réalisé par des personnes compétentes (formations en expérimentation animale) et toute perte de poids significative, signe de douleur ou souffrance notable (cardiaque, respiratoire) de l'animal au cours du développement tumoral constituera le point limite de l'expérience (raffinement). Toutes ces actions sont mises en places afin de respecter la règle des 3Rs. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est de 996.

16444 Le diabète représente un important problème de santé publique et est considéré comme étant l'une des quatre maladies non transmissibles prioritaires ciblées par les dirigeants mondiaux. Une hausse régulière du nombre des cas de diabète et de la prévalence de la maladie a été enregistrée ces dernières décennies. En effet, à l'échelle mondiale, on estime à 422 millions le nombre des adultes qui vivaient avec le diabète en 2014, contre 108 millions en 1980. Ces chiffres reflètent l'augmentation des facteurs de risque associés comme le surpoids et l'obésité. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète est une maladie chronique grave qui se déclare lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline (hormone qui régule la quantité de sucre dans le sang, ou glycémie), c'est le diabète de type 1, ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser correctement l'insuline qu'il produit. On parle alors de diabète de type 2. Ainsi, dans les 2 cas, il y a un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage du glucose (sucre) apporté lors des différents repas de la journée. Il en résulte alors une augmentation du taux de sucre dans le sang, c'est l'hyperglycémie. Cette dernière, conséquence courante d'un diabète non maîtrisé, peut au fil du temps provoquer de graves lésions cardiaques, vasculaires, oculaires, rénales et nerveuses.

La régulation de la fonction des cellules à insuline (c'est-à-dire la sécrétion d'insuline) et leur survie jouent un rôle central dans la progression du diabète. D'une part, la quantité d'insuline à sécréter doit être strictement régulée pour assurer un approvisionnement des tissus en glucose tout en prévenant les hypoglycémies et les hyperglycémies. De plus, dans le cas du diabète de type 2, l'hyperglycémie provient d'une baisse de sensibilité des cellules, en particulier celles du foie, du muscle et du tissu adipeux, à l'insuline. Pour répondre à la demande accrue en insuline découlant de cette insensibilité, les cellules à insuline du pancréas en produisent davantage jusqu'à s'épuiser. La production d'insuline devient alors insuffisante et le glucose s'accumule irrémédiablement dans le sang.

Pour cette étude, nous nous concentrerons sur le rôle du muscle. En effet, ce dernier constitue l'organe le plus sensible à l'insuline de l'organisme et après un repas il joue un rôle majeur dans l'équilibre glycémique de l'organisme. En effet, le muscle est un site majeur de stockage du sucre sous l'action de l'insuline ce qui est crucial pour faire face à une augmentation rapide de la quantité de sucre dans la circulation sanguine après un repas. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une nouvelle voie de communication entre le muscle et les cellules à insuline par le biais de facteurs appelés myokines. Celle-ci est modulée par l'état diabétique et est susceptible de contribuer au maintien d'une masse de cellules à insuline fonctionnelle chez des sujets sains, ainsi qu'à une diminution du diabète. Ainsi, le

muscle est un organe capable de sécréter de multiples facteurs (myokines) pouvant avoir un impact favorable ou défavorable sur la fonction des organes / tissus. Nous avons également montré *in vitro* (îlots pancréatiques de Rat et Humain) et *in vivo*, dans un modèle de transplantation d'îlots chez le rat rendu diabétique de type 1, qu'une myokine particulière naturellement sécrétée par le muscle, que nous appellerons myokine X, permettait d'améliorer la survie, la fonction des îlots pancréatiques et l'équilibre glycémique des animaux diabétiques transplantés. Le nom de cette myokine, représentant un intérêt thérapeutique important pour le patient diabétique, reste anonyme car un brevet est en cours de dépôt.

Désormais, l'objectif de cette demande est de déterminer si un traitement via une injection quotidienne de notre myokine X pouvait également prévenir l'apparition d'un diabète de type 2 et ses complications sur le modèle de Rat ainsi que d'étudier les mécanismes impliqués.

Principe de réduction:

Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum tout en permettant, grâce à des tests statistiques adaptés, de mettre en évidence des différences significatives au niveau des paramètres étudiés. Cette étude nécessitera 48 rats.

Raffinement : Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement. Les animaux seront hébergés dans cages collectives (1800 cm²) par 4, ils 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, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes d'anesthésie et de prise en charge des animaux tout au long de leur séjour dans notre animalerie. 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. En accord avec cette grille d'évaluation, des points limites prédictifs ont été déterminés afin de soustraire les animaux aux procédures expérimentales.

Remplacement : S'agissant d'une validation pré-clinique des effets bénéfiques de notre myokine X sur le développement du diabète de type 2 et de ses complications, nous devons démontrer *in vivo* l'efficacité de notre molécule dans un modèle animal avant de réaliser des tests sur l'Homme. Ainsi, nous réaliserons l'étude sur un modèle de rat qui présente l'avantage de développer un diabète de type 2 similaire à l'Homme.

16445 Les cardiopathies congénitales (CHD) sont les plus répandues des malformations congénitales ; elles représentent 1/3 de ces pathologies. En France, plus de 28 000 cas sont répertoriés chaque année avec 21% de décès dans la première année de vie. Environ 25% des CHD ont besoin d'une chirurgie cardiaque et seront confrontées à des problèmes de santé récurrents. Ces pathologies représentent donc un problème de santé publique majeur. Les CHD définissent un large spectre de déficits structurels et fonctionnels survenant aux stades précoces de l'embryogenèse. 30% de ces défauts affectent le pôle artériel du cœur qui relie les ventricules aux grosses artères. Cette région du myocarde résulte de la contribution des cellules progénitrices du second champ cardiaque (SHF) et défectueuse dans certains cas de CHD.

En tirant parti des technologies de génomiques contemporaines, les recherches ont permis d'identifier différents gènes impliqués dans le développement de CHD. Cependant, seulement 30% des CHD ont pu être corrélées à une origine génétique. A présent, la combinaison des études génétiques et environnementales a pour ambition d'identifier l'origine de certaines CHD. En particulier, l'obésité maternelle qui affecte de façon significative le développement cardiaque chez l'homme et les modèles animaux. Notre étude qui doit être réalisée chez la souris se positionne dans ce contexte, elle relève de la recherche fondamentale et doit permettre des avancées majeures dans le domaine biomédical. Elle étudiera le développement cardiaque chez des embryons issus de mères obèses induites par un fort apport en acides gras en comparaison avec des embryons obtenus de souris soumises à une diète normale. Les recherches seront réalisées sur les stades précoces, dès le 8^{ème} jour embryonnaire (E8.5), lorsque les cellules du SHF sont identifiables, jusqu'à la naissance. Les stades fœtaux seront étudiés afin de mettre en évidence les défauts de développement précoces susceptibles d'impacter les fonctions vitales.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés, soit 725 souris pour un projet d'une durée de cinq années.

Notre projet respectera la réglementation en vigueur et répond à la règle des 3R:

- Remplacement : Ce projet utilisera des souris sauvages ainsi que des souris génétiquement modifiées. Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux car les événements qui nous intéressent se manifestent au cours du développement embryonnaire qui sont propres à l'organisme entier et vivant. In situ l'existence de nombreux facteurs produits par les tissus situés à proximité des cellules progénitrices ne permet pas la réalisation de cette étude en culture de cellules. Pour ce projet les animaux génétiquement modifiés (transgéniques) représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies humaines.

- Raffinement : Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements enrichis par des dômes en cartons ou des lanières de papier kraft. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé, 3 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages. Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier et agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis s'avèrent être atteints. Les observations et les actions entreprises seront indiquées dans le registre des animaux. Tous les arguments sont donc réunis pour permettre la faisabilité de notre projet.

- Réduction : Le nombre d'animaux a été réduit de façon à obtenir suffisamment de données statistiquement significatives pour atteindre l'objectif scientifique fixé en respect du principe de réduction et de raffinement. Dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux en expérimentation nous effectuerons à l'issue de chaque génotypage un tri sélectif des génotypes des embryons afin de les utiliser pour les différentes approches expérimentales envisagées.

16446 Les cardiomyopathies sont des pathologies hétérogènes touchant le muscle cardiaque. Elles sont caractérisées par la destruction de nombreux cardiomyocytes, conduisant à une altération de la fonction cardiaque et in fine à insuffisance cardiaque sévère. Des mutations sur le gène LMNA sont retrouvées dans 10 % des cas de cardiomyopathies et sont à l'origine de cardiomyopathies sévères à progression rapide. Le facteur de croissance fibroblastique FGF10 a été identifié comme une cible thérapeutique potentielle pour la régénération cardiaque dans les cardiomyopathies d'origine ischémique.

Notre projet a pour but d'étudier le rôle du gène Lmna dans le cœur adulte et l'impact du traitement par FGF10 sur la progression de la pathologie cardiaque liée à l'inactivation du gène Lmna. Pour cela la délétion conditionnelle du gène Lmna spécifiquement dans le cœur sera effectuée grâce à l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques particulier. Ces souris seront traitées FGF10 sera administré par injection intra-veineuse. Le phénotype cardiaque sera notamment évalué par échocardiographie.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude de cellules cardiaques en culture ne permet pas d'analyser la fonction cardiaque et les interactions cellules-cellules telles qu'elles sont situées dans le cœur entier. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies humaines.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera 240 souris.

Cette étude sera réalisée 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). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par groupe de 3 à 5 animaux dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton ou de papier kraft. Nos souris feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter précocement les points limites de souffrance.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

-Remplacer : l'utilisation de modèles *in vivo* est nécessaire pour analyser la fonction cardiaque. Il n'existe pas actuellement de modèles *ex vivo* ou *in vitro* permettant de récapituler l'ensemble des conséquences des cardiomyopathies.

-Réduire : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence des anomalies de la fonction cardiaque. De plus, cette étude de type longitudinale permet de suivre les animaux au cours du temps ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés.

-Raffiner : afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs seront définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

16447 Dans la maladie d'Alzheimer, un des enjeux critiques est de mieux comprendre les facteurs de risque et les premiers stades de la maladie afin de mettre au point des thérapies efficaces. Ces dernières années, les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer ont progressé grâce à l'utilisation de la technique de remplacement de gènes (knock-in : KI). Cette technique permet d'éviter les effets secondaires de la surexpression de protéines. De plus, elle permet d'intégrer des gènes humains à la place de ceux de l'animal pour qu'il exprime les protéines clé de la pathologie et ainsi favoriser des types d'interaction spécifiquement humaine. Ces modèles devraient donc se rapprocher encore plus de la pathologie humaine. L'un de ces modèles, les souris dKI doublement humanisées pour les gènes App et MAPT, présente une différence sexuelle dans l'émergence des premiers symptômes cognitifs évalués grâce à des tests de reconnaissance d'une grande sensibilité. En effet, nous avons découvert que les femelles dKI présentent un déficit de mémoire de reconnaissance d'objet après un délai de 24h (RO24h) dès l'âge de 2 mois, contrairement aux mâles testés de 2 à 6 mois. A cet âge, les souris n'ont pas encore de dépôts amyloïdes, un marqueur classique de la pathologie Alzheimer dans le cerveau. Le déficit de reconnaissance d'objet à 24h dépend notamment du dialogue entre deux régions cérébrales, l'hippocampe et le cortex préfrontal. Or des données récentes suggèrent que la communication entre ces deux régions est affectée dans les tout premiers stades de la maladie, alors que les patientes ne présentent pas encore de problème dans leur vie quotidienne. Notre but est de trouver l'origine de cette sensibilité précoce des femelles dKI en étudiant le rôle des œstrogènes dans ces problèmes de reconnaissance d'objet et la qualité du dialogue entre l'hippocampe et le cortex préfrontal. Le cycle hormonal sera étudié grâce au frottis vaginal et les œstrogènes seront dosés dans ces régions pour voir s'ils sont à l'origine des déficits des femelles dKI. Dans ces mêmes régions, nous étudierons les modifications de la structure des neurones et de leurs voies de signalisation cellulaires qui sont connues comme étant des supports de la formation de la mémoire à long terme d'un objet.

Ce projet respecte au plus près la règle des 3R :

Remplacer. L'étude des relations entre les troubles de la mémoire et les anomalies du fonctionnement neuronal induits par une pathologie Alzheimer nécessite l'utilisation de l'animal vivant. Les modèles *in vitro* ou computationnels ne permettent pas à ce jour de rendre compte de la complexité des fonctions de la mémoire : ils ne reproduisent pas les changements d'activité des neurones dans le circuit cérébral impliqué dans la mémorisation d'un événement et ils ne peuvent pas reproduire la réponse comportementale permettant d'évaluer la performance dans un test. Réduire. Le nombre d'animaux sera au maximum de 15 animaux par groupe pour assurer l'efficacité des statistiques dans les tests de mémoire. Cet effectif est nécessaire en particulier dans notre modèle car nous testons des souris avec une pathologie émergente donc avec des déficits subtils qui pourraient passer inaperçus si les groupes sont trop petits. L'ensemble du projet requiert 552 souris. Raffiner: Les souris bénéficieront d'éléments d'enrichissement dans leur cage (matériel de construction du nid, un tube refuge et des boulettes de nourriture à manipuler dans la cage), ainsi qu'un suivi quotidien de leur état général. Elles seront maintenues en groupe sociaux sauf pendant les tests de mémoire. Tous les tests sont basés sur le comportement d'exploration spontanée de la souris. Un suivi spécifique à chaque procédure avec des points limites adaptés sera mis en place pour éviter toute souffrance éventuelle.

16448 De nombreux états pathologiques (cancers, sepsis...) sont associés à une cachexie (perte de masse corporelle non-réversible) résultant d'un catabolisme accru et une perte d'appétit. Les anorexies secondaires à la pathologie sont observées pour près de la moitié des patients atteints de cancers, pour lesquels les traitements de chimiothérapie sont également générateurs de dérégulation métabolique et d'inhibition de la prise alimentaire. La perte d'appétit représente un problème clinique majeur car dans ce contexte où les réserves énergétiques s'épuisent et les muscles s'atrophient, l'état de dénutrition provoqué par l'anorexie vient accroître l'affaiblissement de l'organisme et la dégradation de la santé du sujet. Même si un lien entre inflammation et perte d'appétit est bien établi, les mécanismes sous-jacents de la perte d'appétit sont mal connus. Nos données et celles de la littérature nous ont orienté vers le rôle possible d'un mécanisme de stress impliquant le facteur de transcription ATF4.

Dans notre projet le paramètre principalement étudié étant la prise alimentaire, nous avons besoin d'utiliser un organisme modèle entier ayant un métabolisme basé sur le dialogue entre plusieurs organes et comparable à celui de l'Homme. Nous ne pouvons donc pas utiliser de méthodes de remplacement comme alternative pour cette étude et aurons recours à l'expérimentation animale. Nous avons choisi le modèle de la souris pour les raisons suivantes : 1) la bonne connaissance du métabolisme, 2) le temps de génération réduit, 3) la disponibilité des outils moléculaires et 4) la disponibilité des modèles génétiquement modifiés. En effet notre objectif étant de savoir si le mécanisme ATF4-dépendant joue un rôle pré-pondérant, nous mettrons en place deux types de modèles complémentaires invalidés pour ce mécanisme, un modèle pharmacologique et un modèle génétique.

Deux modèles d'anorexie associée à la pathologie catabolique inflammatoire seront utilisés : 1) administration de lipopolysaccharide bactérien de manière transitoire (injection simple) ou chronique (implantation d'une pompe osmotique sous la peau), 2) greffe de cellules cancéreuses associée ou non à un traitement de chimiothérapie (modèle se rapprochant davantage de la pathologie). Dans un premier temps les effets associés à ces modèles seront caractérisés chez des souris « sauvages », en terme de paramètres physiologiques (profil de prise alimentaire et évolution du poids corporel) et de paramètres biochimiques et moléculaires (prélèvements de plasma et de différents tissus en post-mortem). Dans un second temps les modèles d'anorexie seront mis en place dans un contexte d'invalidation du mécanisme ATF4-dépendant selon deux méthodes complémentaires utilisant, 1) un inhibiteur pharmacologique et 2) des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas ATF4. Ceci nous permettra de connaître l'importance d'ATF4 dans la mise en place de l'anorexie.

Nous utiliserons uniquement des souris adultes. Les souris transgéniques utilisées dans ce projet seront issues de l'élevage interne maintenu par notre établissement. Nous prévoyons d'utiliser, à raison de 4 à 8 animaux par groupe selon les expériences et au vu du nombre d'études à mener, 850 animaux sur 5 ans. Basé sur les données de la littérature et des expériences antérieures du laboratoire, ce nombre d'animaux est le nombre minimum nécessaire mais suffisant afin d'obtenir des résultats exploitables. Des mises au point d'affinement de la technicité et de détermination des doses efficaces pour les traitements seront pratiquées de manière à lancer des expérimentations de plus grande ampleur dans des conditions définies et maîtrisées. Cela permet de réduire le risque d'erreur et évite que l'on ait à répéter une expérience inutilement. Nous veillerons au bien-être des animaux tout au long de leur vie en leur assurant les meilleures conditions d'hébergement : environnement contrôlé (température de 22°C et cycle jour/nuit 12h/12h) et enrichissement du milieu de vie (tubes en plastique dans les cages), avec surveillance quotidienne par le personnel. Ces conditions seront maintenues que ce soit en élevage ou dans les expérimentations. De plus, au cours de la phase d'élevage, les animaux seront autant que possible laissés en groupe de 5-6 individus (à l'exception des mâles en post-reproduction). Au cours des expérimentations visant à mesurer la prise alimentaire, les animaux devront être isolés. Une attention particulière sera portée aux animaux, par le personnel de l'animalerie et par les expérimentateurs. Les souris seront adaptées à leur environnement avant l'expérimentation. Des drogues anesthésiques et analgésiques seront utilisées lors de la mise en œuvre des procédures douloureuses. Les conditions d'élevage des animaux et la mise en œuvre des procédures seront optimisées de manière à réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subis par les animaux. Des points limites précis ont été définis. Si un animal présentait un état

douloureux inacceptable, ou des signes de mal-être important, il serait éliminé de l'expérimentation et, si nécessaire, anesthésié puis euthanasié, sur décision coordonnée entre le responsable du projet et un représentant de la structure du bien-être animal.

16449 Le but de cette unité d'enseignement (UE) de 1^{ère} année du master Sciences du Vivant Parcours Biologie Cellulaire et Physiologie Animale est l'acquisition de connaissances de la neurobiologie de grands répertoires comportementaux tel que la mémoire dans la perspective de poursuivre un parcours orienté vers la physiopathologie cérébrale de maladies neurologiques. Cela s'appuie sur une formation pratique solide en neurosciences et physiologie. Pour cela, dans le cadre de cette unité d'enseignement, les étudiants auront ainsi à pratiquer sur l'animal, dans le respect et la mise en oeuvre du cadre réglementaire en matière d'expérimentation animale, encadrés par des enseignants chercheurs confirmés en matière d'expérimentation animale, uns des deux tests comportementaux dédiés à l'évaluation des performances d'apprentissage et de mémorisation dans le labyrinthe en Y (mémoire à court terme) et le labyrinthe aquatique de Morris (mémoire spatiale à court et à long terme). Par rapport aux principes de la règle des 3R, le recours à l'animal entier, seul niveau d'organisation permettant une approche des performances cognitives, est nécessaire, 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 au maximum de 80 souris par année (dépendant du nombre d'étudiant), 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 (Réduction). Le nombre total d'animaux qui sera utilisé pour ce projet d'une durée de 5 ans sera donc de 400 souris. Pendant le TP, les étudiants manipuleront les animaux dans le respect des règles fixées par les contraintes réglementaires et assureront le bien-être des animaux, sous la supervision des enseignants chercheurs de l'équipe pédagogique tous certifiés de niveau Concepteur sur Rongeurs et formés aux techniques utilisées (Raffinement). Les tests pratiqués sur les animaux seront de gravité légère à modérée. Les animaux seront maintenus dans des conditions d'élevage contrôlé (température, humidité, cycle jour/nuit inversé) dans des cages adaptées et enrichies. Ils seront surveillés quotidiennement afin de détecter les points limites relatifs à un état de mal-être persistant (perte de poids corporel supérieure à 10% du poids de départ, perte de poids >20% sur 3 jours, poils ébouriffés, signes comportementaux anormaux (prostration, hyperactivité, signes d'agressivité vis-à-vis des congénères ou du personnel, cris récurrents). Les souris utilisées pour ces TP seront ré-introduites dans un autre enseignement sur décision prise par le responsable de la structure en charge du bien-être animal avec le responsable du projet et/ou mises à mort à l'issue des tests comportementaux selon une méthode réglementaire et les cadavres conservés en vue des TP de dissection dispensés par ailleurs en vertu des principes de Réduction et de Raffinement de la règle des 3R.

16450 Le cancer colorectal (CRC) est le plus fréquent des cancers digestifs et le troisième cancer le plus fréquent dans le monde. L'implication du microbiote intestinal dans l'initiation et la promotion de la carcinogénèse colorectale est globalement acceptée, et démontrée. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), dont la prévalence est en augmentation dans le monde en général et en Europe en particulier, peuvent se compliquer de CRC, très redouté dans cette population de patients jeunes, atteints d'une maladie qui n'est pas mortelle. Le microbiote intestinal est également impliqué dans la physiopathologie de ces maladies inflammatoires. En effet, l'altération de la composition et de la fonctionnalité du microbiote intestinal (appelée dysbiose) a été décrite dans de nombreuses maladies chroniques intestinales ou extra-intestinales, qu'elles soient de nature inflammatoire, métabolique ou tumorale. Cette dysbiose entraîne une altération de la barrière épithéliale intestinale, une inflammation systémique et la génération de signaux de stress oxydatif vers la lumière digestive.

Notre projet découle d'une avancée récente démontrant que la molécule REG3A est un régulateur du microbiote intestinal, capable de lutter contre l'inflammation intestinale chez des souris atteintes de colite. REG3A est synthétisée dans le foie de souris et est excrétée, via la bile, dans la lumière digestive. Cette protéine possède une activité immuno-modulatrice et anti-inflammatoire remarquable. Actuellement, son rôle dans la carcinogénèse colique reste controversé. Une étude préliminaire de

notre équipe a montré une nette diminution de l'incidence du cancer colorectal sur colite inflammatoire chez des souris exprimant REG3A humain comparé à des souris sauvages. Notre hypothèse est donc que REG3A régule négativement les voies de carcinogénèse colorectale par un mécanisme non identifié qui pourrait impliquer le microbiote intestinal.

L'objectif de notre étude est de confirmer le phénotype observé, vérifier si l'éventuelle protection conférée par REG3A contre le CRC est associée à son rôle de modulateur du microbiote intestinal et caractériser les mécanismes anti-tumoraux à l'œuvre.

Dans le cas précis de ce projet, le modèle animal expérimental est indispensable devant l'absence de modèle cellulaire d'étude des cancers colorectaux liés aux MICI et la nécessité d'étudier les interactions hôte-microbiote-cancer régulées par REG3A, et donc le microenvironnement tumoral. L'équilibre homéostatique entre les différentes bactéries qui composent le microbiote intestinal est modulé par de nombreux facteurs métaboliques et environnementaux qu'il est impossible de recréer *in vitro*.

Nous avons choisi un modèle expérimental d'étude de la carcinogénèse colique induite sur colite non métastatique reconnu par la communauté scientifique. Il s'agit du modèle chimique Azoxymethane(AOM) - Dextran sodium sulfate (DSS) qui consiste à administrer une dose unique de mutagène AOM par voie intrapéritonéale suivi par 3 cycles successifs de 5 jours de DSS dans l'eau de boisson entrecoupés par 14 jours d'eau plate pour induire une colite. Les souris développeront des lésions coliques pré-néoplasiques microscopiques sans signes cliniques spécifiques au cancer sur un épithélium intestinal inflammé. Cette inflammation modérée et de courte durée (3-4 jours) se manifesterà par une diarrhée et du sang fécal qui s'amèneront après arrêt du DSS et régénération de l'épithélium. Des lésions de cancer colorectal (CRC) apparaitront à partir du deuxième cycle de DSS sans qu'elles aient un impact clinique de type cachexie, douleur ou occlusion intestinale sur l'état des souris. Nous proposons d'utiliser ce modèle dans 3 lignées de souris de fond génétique commun C57Bl/6N : 1 lignée de souris sauvages contrôles (WT), 1 lignée de souris transgéniques (TG-REG3A) exprimant constitutivement REG3A humain, et 1 lignée de souris knockout (KO) pour l'homologue murin Reg3b du gène humain. Afin de déterminer si l'effet antitumoral de REG3A est associé à son activité de régulation du microbiote intestinal, nous avons choisi un modèle de modulation bactérienne par transplantation de fèces issus de souris transgéniques REG3A à des souris sauvages conventionnelles. Afin de mieux comprendre la chronologie des mécanismes antitumoraux engagés, et plus particulièrement, pour déterminer si la diminution de l'incidence du cancer colorectal chez les souris TG-REG3A est due à une carcinogénèse retardée ou à un ralentissement dans les mécanismes de progression tumorale, nous avons décidé de réaliser des sacrifices précoces au cours de l'étude. Ces sacrifices auront lieu au après le deuxième cycle de DSS, c'est-à-dire au début de la carcinogénèse colique. Au total, 130 souris seront incluses dans l'étude.

Lors de l'élaboration de notre projet, nous avons pris en compte la règle des 3R.

Remplacer : il n'est pas possible de remplacer le modèle animal dans cette expérimentation par une méthode alternative. Cependant, de nombreuses expériences *in vitro* pour déterminer les effets de la lectine REG3A au niveau cellulaire ont été réalisées au préalable laissant suggérer un effet.

Réduire : afin d'être sûr de n'inclure dans l'étude que le nombre d'animaux strictement nécessaire pour obtenir des résultats significatifs, un calcul d'effectif avec une puissance de 80% a été réalisé. Les 3 lignées utilisées sont de même fond génétique ce qui permet de réduire le nombre de souris contrôles et d'assurer une meilleure reproductibilité des résultats en ayant un échantillon le plus représentatif possible avec un nombre d'animaux réduit.

Raffiner : une surveillance individuelle quotidienne des animaux sera réalisée avec la mise en place de critères d'arrêt. Tout animal présentant des signes de souffrance sera euthanasié. Nous allons chercher à réduire le plus possible les manipulations impliquant la contention des animaux en y préférant l'utilisation de boîtes stériles et de puces Biolog-Tiny sous-cutanés, par exemple, pour les pesées. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera fait avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

16451 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un composé en développement, de type probiotique, destinés à l'amélioration des troubles métaboliques,

notamment l'obésité. Des données antérieures ont démontré la capacité du composé X à réduire le poids corporel de souris rendues obèses par une alimentation enrichie en graisse, cet effet étant rapide (effet mesurable après 2-3 jours de traitement) et prolongé (effet toujours mesurable après plusieurs semaines de traitement).

L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé sur la prise alimentaire chez des souris nourries par un régime hyperlipidique (45% de l'énergie issue des graisses) pendant 2 semaines dans le cadre d'un protocole de renutrition après une période de mise à jeun. Le protocole de renutrition est un protocole classiquement employé afin d'étudier à court terme les effets d'un composé sur la prise alimentaire. Il consiste à mesurer la prise alimentaire des animaux traités à l'aide du composé X ou du véhicule sur une durée déterminée suivant une période de jeun de 6h ou de 12h. En effet, la mise à jeun est connue pour induire un état d'hyperphagie réactionnelle chez le rongeur, ce qui constitue une situation expérimentale idéale pour mesurer finement les effets d'un composé anti-obésité sur la prise alimentaire.

Le traitement sera administré par voie orale pendant 16 jours, après une période d'acclimatation de 14 jours des animaux à notre animalerie. Le protocole de renutrition sera réalisé au 14ème jour de traitement.

La présente étude nécessitera l'emploi de 60 souris C57Bl/6 réparties en 6 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 individuelles afin de permettre la mesure de prise alimentaire journalière individuelle, mais les cages (transparentes) seront positionnées côte à côte de façon à maintenir un contact visuel entre les animaux et atténuer la sensation d'isolement. Par ailleurs, un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification ainsi que de briquettes de bois spécifiques pour rongeur. 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 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 la consommation alimentaire.

16452 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 troisième 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. 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 double

- Comprendre la physiopathologie des maladies auto-immunes 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 ont une durée pouvant aller jusqu'à 18 semaines. Elles incluent des observations cliniques, des prélèvements sanguins pour dosage de glycémie, d'autoanticorps et cytokines, éventuellement des traitements, et des mesures du taux de médicament dans le sang. Les 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 micro-sampling).

Les objectifs sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Il n'est pas possible de remplacer complètement l'usage du modèle animal dans ce projet car de nombreux organes sont impliqués dans le processus pathologique. Un nombre minimal de 10 animaux par groupe est requis pour s'assurer de la validité scientifique de l'étude dans ces modèles.

Dans ce projet il est prévu d'utiliser au maximum 2625 souris sur une durée de 5 ans, ce qui représente 5 études par an avec 105 souris par étude. Le nombre de rongeurs utilisés est calculé en fonction de la variabilité des paramètres examinés et confirmé par une analyse statistique.

Etant donné la pathologie développée par les animaux, le projet sera considéré comme sévère, Des grilles de points-limites seront 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.

16453 Les troubles du spectre autistique (TSA) constituent un groupe hétérogène de pathologies neurodéveloppementales caractérisées par des altérations de l'interaction sociale et des comportements d'intérêts restreints, stéréotypés et répétitifs. L'augmentation des taux de diagnostic des TSA et l'absence de traitement rendent urgent l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il n'y a pas de cause unique aux TSA, mais les recherches actuelles suggèrent fortement qu'il existe des bases neurologiques et génétiques. Le gène TSHZ3 est associé aux TSA et participe au développement et au fonctionnement du système nerveux.

Pour comprendre "où" et "quand" le gène Tshz3 est essentiel pour le développement et le fonctionnement des circuits neuronaux en relation avec les TSA, nous proposons de réaliser des études comportementales et anatomo-fonctionnelles sur différents modèles de souris Tshz3. Notre établissement possède un agrément pour l'expérimentation animale (Statut EOPS). Les souris sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements enrichis par la présence d'objets, au sein d'une animalerie exempte de pathogènes et dont les paramètres physiques et sanitaires sont strictement

contrôlés. Les animaux sont examinés quotidiennement afin de prévoir l'apparition éventuelle de douleur/mal être et veiller à ne pas dépasser des points limites. Mise en œuvre de la règle des 3R :

Remplacement : Les comportements caractéristiques des TSA ne peuvent être étudiés qu'*in vivo* et les méthodes *in vitro* ne peuvent pas remplacer l'organisme entier en raison de l'isolement des neurones du contexte physiologique.

Réduction : En respectant les bonnes pratiques, nous nous efforçons de minimiser la variabilité induite par le stress. L'analyse statistique des résultats obtenus précédemment avec les mêmes méthodes expérimentales permet de réduire le nombre d'animaux utilisés (203) au strict nécessaire. Le calcul pour ce projet est détaillé dans la partie 3.4.10

Raffinement : Les souris sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements enrichis (carrés en coton compressé pour la nidification, abris de type igloo et bâtons de bois). Elles disposent de nourriture et d'eau ad libitum.

16454 Le but de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'une chimiothérapie vectorisée par une nanoémulsion, sur des animaux porteurs d'un glioblastome. Cette chimiothérapie sera assistée par l'ouverture de la barrière hémato encéphalique et la libération contrôlée du principe actif grâce à des ultrasons focalisés de haute intensité.

Le glioblastome compte parmi les tumeurs cérébrales primitives les plus communes et reste actuellement incurable malgré une prise en charge combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Il existe donc un besoin important de nouvelles options thérapeutiques dans cette pathologie. Dans ce contexte, une vectorisation des actifs anticancéreux existants permettrait d'améliorer leur efficacité thérapeutique ainsi que leur profil de tolérance, en favorisant la libération de la molécule active au niveau tumoral et en minimisant celle-ci ailleurs dans l'organisme.

Nous avons développé des nanoémulsions permettant l'encapsulation de molécules anticancéreuses hydrophobes, et en particulier du docétaxel (DTX), qui est actif *in vitro* sur les cellules de glioblastome et déjà utilisés face à plusieurs autres types de cancers. Ces nanoémulsions à base de perfluorocarbures contiennent des nano-gouttes d'une taille inférieure à 100 nanomètres, qui ont l'avantage de permettre une libération contrôlée de principe actif. En effet, leur exposition à une stimulation ultrasonore accélère la libération du médicament qu'elles contiennent. L'application d'ultrasons à une région donnée de l'organisme permettra donc de contrôler précisément le site de libération du médicament, et ainsi de mieux contrôler ses effets.

D'autre part, l'efficacité des chimiothérapies classiques sur le glioblastome est limitée par la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui restreint le passage de nombreux agents anti-cancéreux depuis le compartiment sanguin vers le tissu cérébral. Mais nous pouvons obtenir une ouverture temporaire et localisée de la BHE par application d'ultrasons grâce à un dispositif adapté au petit animal. Ainsi, la BHE peut être localement perméabilisée au niveau tumoral pour favoriser le passage du vecteur anticancéreux.

Nous avons démontré *in vitro* la biocompatibilité des nano-gouttes et de leurs différents composants sur plusieurs modèles cellulaires. De plus, les doses de nano-gouttes administrées aux animaux ne dépasseront pas les seuils de toxicité connus pour chacun de leurs composants pris isolément, il n'est donc pas attendu de toxicité liée aux nano-gouttes elles-mêmes.

Plusieurs étapes seront nécessaires préalablement à l'évaluation de l'efficacité du traitement. Au total, pour la détermination de la dose maximale tolérée, l'étude pharmacocinétique, l'optimisation des conditions d'ouvertures de BHE et de libération contrôlée, et enfin l'étude d'efficacité, 483 souris C57BL/6 seront requises.

Ce projet a été conçu dans le respect des principes des 3R. Concernant le principe de remplacement : les modèles animaux restent encore aujourd'hui irremplaçables en oncologie, notamment en raison du rôle crucial joué par le système immunitaire dans la croissance tumorale, et qui ne peut à ce jour être modélisé de façon satisfaisante *in vitro*. Nous utiliserons en particulier la souris, dont l'utilité en tant que modèle en oncologie est largement reconnue dans la littérature scientifique. Concernant le principe de réduction : l'effectif minimal nécessaire à chaque groupe a été déterminé sur la base des connaissances acquises lors d'expériences similaires antérieures et grâce à un modèle statistique

(<https://biostatgv.sentiweb.fr/?module=etudes/sujets>) en fixant la puissance statistique à 80%. Concernant le principe de raffinement : la nécessité du bien-être animal sera prise en compte par le respect des normes d'hébergement, par l'utilisation d'une anesthésie et d'une analgésie appropriées lors des procédures, ainsi que par la surveillance quotidienne des animaux et leur mise à mort en cas d'atteinte des points limites (signes précoces de souffrance définis dans une grille de score, perte de poids supérieure ou égale à 20%).

16455 Données épidémiologiques : *Clostridium difficile* est une bactérie anaérobie strict, sporulante, et première cause de diarrhée nosocomiale bactérienne chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées dont la plus connue est la colite pseudomembraneuse et marquée par 3% de mortalité). La contamination se fait à partir des spores, formes de résistance et hautement contagieuse de la bactérie, largement présentes dans l'environnement des services de soins hospitaliers. Les infections à *C. difficile* (ICD) peuvent évoluer sur un mode épidémique avec la survenue de cas groupés d'infection dans les services de soins puis dans l'ensemble de l'établissement voire sur tout un territoire de santé (exemple de l'épidémie qui a touché tout le Nord de la France en 2006), et représente un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés, entre autres. Malgré des traitements antibiotiques généralement efficaces, les récurrences des infections à *C. difficile* sont fréquentes (environ 20%) et des résistances aux antibiotiques apparaissent.

Physiopathologie : La bactérie produit des toxines qui sont majoritairement responsables des signes cliniques et des lésions observées dans l'intestin. Cependant, d'autres facteurs interviennent dans l'établissement de l'infection, au cours de la première étape qui correspond à la colonisation du tube digestif de l'hôte par *C. difficile*. Notre laboratoire s'est spécialisé dans l'étude de cette étape de colonisation, et travaille notamment sur le rôle de différentes protéines et polysaccharides de surface dans cette étape importante d'implantation de la bactérie, les processus d'adaptation de la bactérie à l'hôte, et le rôle de la formation de biofilm.

Rationnel du projet proposé et perspectives : Différentes protéines et polysaccharides de surface impliqués dans cette colonisation ont été caractérisés. Du fait de la localisation intestinale de cette infection, le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre les polysaccharides de surface par une vaccination par voie muqueuse peut être une stratégie efficace dans la prévention des infections à *C. difficile* (ICD). L'objectif de cette étude est de réaliser des essais de vaccination à l'aide de deux polysaccharides de surface de *C. difficile*, tous deux couplés à une protéine porteuse, la BSA. Ces essais seront réalisés dans un modèle hamster, animal très sensible aux infections à *C. difficile* permettant de mettre en évidence l'effet protecteur des anticorps produits lors des immunisations. L'identification des facteurs de virulence nécessaires à la colonisation de l'hôte est un préalable indispensable à l'identification de nouvelles stratégies de lutte contre les infections à *C. difficile* incluant à la fois des schémas de prévention mais aussi le développement de nouvelles cibles thérapeutiques (antibiotiques, immunisation, ...) visant à empêcher cette étape précoce de colonisation.

96 animaux, à raison de 8 hamsters par groupe, seront nécessaires au maximum afin de tester les différents antigènes. Le nombre d'animaux sera respecté, tout en conservant une puissance statistique suffisante qui permettra de conclure sur ces expériences sans avoir besoin de les renouveler (cf projet). L'exigence de réduction, raffinement, et remplacement des animaux sera respectée. Concernant le 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.

16456 Il s'agit d'un projet de recherche fondamentale appliqué au domaine de la santé. Il concerne l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les maladies cardiovasculaires dans un contexte d'ischémie/reperfusion cardiaque.

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. En 2013, environ 17 millions de décès seraient imputables aux maladies cardiovasculaires, soit 30% de la mortalité mondiale totale. D'ici 2030, près de 23,3 millions de personnes mourront d'une maladie

cardiovasculaire et d'après les projections de l'OMS, ces maladies devraient rester les premières causes de décès. L'évolution de l'impact des maladies cardiovasculaires correspond à l'augmentation de la prévalence des facteurs de risque cardiovasculaires.

Le but de ces travaux est d'évaluer le rôle d'acteurs cellulaires, par le pré/post-conditionnement pharmacologique, mais également d'évaluer l'impact du vieillissement, dans les mécanismes de cardioprotection. Ce projet porte sur l'étude des fonctions cardiaques sur un cœur perfusé *ex vivo* de rat afin d'aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la cardioprotection, pour in fine, permettre de développer des traitements visant de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ces travaux nécessiteront l'utilisation de 468 rats au maximum sur 5 ans. Ce nombre de rat est nécessaire pour la réalisation des 4 procédures de ce projet, comprenant les différentes études *ex vivo* sur le modèle de cœur perfusé (120 et 84 rats), l'étude de substances pharmacologiques dans un modèle *in vivo* d'ischémie/reperfusion myocardique (120 rats) ainsi que l'étude du conditionnement ischémique à distance (144 rats). Les modèles cellulaires existants ne permettent pas d'étudier l'ensemble des paramètres fonctionnels cardiaques dans le système cardiovasculaire tels que la puissance cardiaque, la contractilité, la pression ou les vitesses de relaxation et de contraction. L'étude des mécanismes de cardioprotection dans un contexte d'ischémie/reperfusion sur les paramètres fonctionnels cardiaques, nécessite l'utilisation d'un organe isolé fonctionnel ou d'un organisme entier pour considérer les différents systèmes de régulation cardiaque. Le modèle *in vivo* est indispensable pour assurer la pertinence des résultats, car la fonction cardiaque est régulée par des systèmes coordonnés qu'on ne peut pas reproduire *in vitro*.

L'élevage des animaux et l'ensemble des expérimentations sont réalisées 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) intégrant la réduction du nombre d'animaux, le raffinement et la réduction de la douleur. Le nombre d'animaux a été réduit au strict nécessaire pour mener à bien cette étude scientifique innovante afin d'atteindre la puissance statistique suffisante pour obtenir des résultats exploitables. Le recours à des animaux est exploité au maximum par le partage d'animaux entre équipes pour d'autres travaux de recherche compatibles avec ce projet.

Afin de raffiner la méthodologie utilisée, l'état actuel des connaissances a été pris en compte pour le choix de l'espèce et du protocole. Les conditions d'hébergement et les soins des animaux tiennent compte de leur sensibilité et des contraintes liées à l'espèce. Les points limites adaptés au projet ont été établis afin de prévenir, réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, ou l'angoisse subie par les animaux et ainsi favoriser le bien-être des animaux tout au long de leur vie.

16457 Le Gliome Pontique Diffus Intrinsèque (DIPG) est une tumeur pédiatrique du système nerveux central (SNC). Elle est la première cause de mortalité infantile par tumeur du SNC. L'arsenal thérapeutique pour traiter cette tumeur est très limité : à ce jour seule la radiothérapie à visée palliative en constitue la prise en charge. La chirurgie de résection ne peut être pratiquée du fait du caractère infiltrant de la tumeur, et les chimiothérapies efficaces *in vitro* présentent une efficacité nulle *in vivo*, du fait qu'elles se retrouvent en concentration insuffisante dans le cerveau, hautement protégé par une structure appelée la barrière hémato encéphalique (BHE).

Différents composés dont des cytotoxiques ont été testés sur une lignée cellulaire tumorale issue de patient atteint de DIPG, et il apparaît que des « camptothécines » sont actives. Malheureusement, ces molécules (comme beaucoup d'autres traitements) ne diffusent pas suffisamment dans le cerveau du fait de l'importante étanchéité de la BHE.

Nous développons des thérapeutiques vectorisées des composés actifs *in vitro* sur la base de modifications chimiques afin de mieux cibler le cerveau et la tumeur. Cette vectorisation permet une meilleure pénétration cérébrale via une interaction ligand-transporteur/récepteur à la BHE.

Les meilleurs candidats médicaments sont évalués par une batterie de tests fonctionnels *in vitro* et *in vivo* avant d'être testés chez modèle de rat mimant cette pathologie. Ce modèle nous permet d'étudier et quantifier *in vivo* l'activité anti tumorale du composé vectorisé.

Notre objectif est donc de déterminer l'activité anti-tumorale de deux composés chimiques optimisés en comparaison de l'agent non vectorisé. L'étude de l'efficacité anti-tumorale ne peut être réalisée que sur un organisme vivant.

Le nombre d'animaux estimé est de 130 rats.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. La souffrance et l'anxiété infligées aux animaux seront limitées au maximum, une surveillance journalière sera mise en place et des points limites adaptés ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Les procédures se dérouleront sous anesthésie générale systématique avec des analgésiques en cas de souffrance. Les animaux sont hébergés à plusieurs dans une même cage pour favoriser l'interaction sociale, et dans un milieu adapté et enrichi afin de stimuler le bien-être animal.

L'identification de traitements efficaces et traversant efficacement la BHE devrait avoir un impact significatif dans les futures alternatives thérapeutiques pour le DIPG.

16458 Les traitements antalgiques de la migraine restent encore de nos jours insatisfaisants. En effet, les traitements de crise à base de triptans ou même d'opioïdes ont une efficacité relativement limitée et peuvent provoquer des effets indésirables importants. De plus ces composés sont à l'origine de ce que l'on nomme "abus médicamenteux" qui augmente l'intensité et la fréquence des crises chez des patients encore plus sensibles.

D'autres cibles moléculaires peuvent cependant être envisagées avec en particulier les inhibiteurs d'enképhalines (IENk) qui bloquent la dégradation des opioïdes endogènes. Ces composés constituent un nouvel espoir dans le traitement de la migraine car, en plus d'être dénués des effets secondaires des opioïdes, des travaux préliminaires ont montré une activité antalgique dans un modèle de migraine par donneur de NO chez le rat. Ce modèle, utilisé dans ce projet, permet de mesurer une allodynie mécanique céphalique après injection systémique intrapéritonéale d'ISDN, un donneur de NO (monoxyde d'azote) connu chez l'homme pour déclencher des crises de migraine.

Le but de ce projet est de déterminer si un traitement chronique à base d'un IENk est susceptible à lui seul d'entraîner chez le rat une sensibilisation centrale latente à l'origine d'une allodynie persistante et aussi d'une hypersensibilité à la migraine.

Pour ce faire, nous procéderons à une série d'administrations orales (une tous les 2 jours pour un total de 6 administrations) et mesurons ensuite le seuil de retrait facial à la suite de stimulation mécanique légère de la peau (test de von Frey) et ce tous les jours pendant 10 jours. Au 21^{ème} jour, nous réaliserons une injection du donneur de NO par voie systémique afin de déclencher une "crise allodymique".

Trois traitements oraux seront utilisés : un traitement par l'IENk dont les données seront comparées à un traitement (témoin positif) par sumatriptan, molécule reconnue comme traitement anti-migraineux de référence mais avec un potentiel de sensibilisation latente et d'abus médicamenteux, et à un traitement (témoin négatif) par serum physiologique.

A partir de ces groupes d'animaux, une analyse immunohistochimique du taux d'expression cérébral du CGRP (calcitonin gene related peptide) sera réalisée après mise à mort par overdose d'anesthésique. Ce peptide est un élément neurochimique fondamental de la physiopathologie de la migraine, et sa variation d'expression nous sert ici de marqueur de sensibilisation centrale.

Les résultats attendus sont : - par comparaison au traitement serum physiologique, nous attendons une allodynie (abaissement du seuil de retrait facial) qui se développe à la suite du traitement chronique de sumatriptan et une crise (abaissement du seuil) plus intense à la suite de l'injection du donneur de NO ; - pour ce qui est du traitement IENk, nous n'avons pas a priori mais en cas de non développement de l'allodynie et de non aggravation de la crise, il en ressortira que le IENk peut constituer un traitement antalgique sans les effets secondaires des triptans.

Toutes les expériences seront réalisées à la fois chez le mâle et la femelle sachant que chez l'homme et chez le rongeur il a été montré une différence de sensibilité dans le cas de l'abus par traitement antimigraineux.

Afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats (90 au total) pour 6 groupes (3 mâles et 3 femelles) de 15 animaux tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si la distribution est normale ou un test non paramétrique dans le cas contraire). Le recours à l'animal vivant pour le projet est justifié par le fait que l'étude des effets antalgiques de l'agent pharmacologique ne peut être réalisé que sur un animal conscient. Sachant que cette étude, du fait même de sa nature (étude douleur), ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions d'injections et de mesure, toute observation de signes (points limites) tels que la prostration, l'impossibilité de manipulation, à se mouvoir, ou une perte de poids supérieure à 15-20%, mettrait fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection léthale d'anesthésique.

16459 L'obésité est une maladie chronique et un problème de santé publique majeur. En France l'obésité touche près de 15% de la population. Son incidence est en augmentation constante depuis plusieurs années.

Actuellement la chirurgie bariatrique appelée aussi chirurgie de l'obésité, qui enlève une partie de l'estomac et souvent une partie de l'intestin du circuit des aliments, est le traitement de référence de l'obésité quand elle est dite morbide (c'est-à-dire avec un indice de masse corporelle (poids/taille au carré) ≥ 40).

L'intervention chirurgicale de référence est appelée « Bypass Gastrique Roux-en-Y » (RYGB). Cependant malgré son efficacité, jusqu'à 20% des patients sont en échec à long term après cette chirurgie.

La « sleeve gastrectomie avec bipartition du transit » (SGTB), est une nouvelle chirurgie de l'obésité qui commence à être réalisée en France sur les patients. Elle serait supérieure sur la perte pondérale et l'amélioration du diabète avec moins d'échec à long terme que le RYGB.

Cependant, dans la littérature, il n'existe pas de données sur l'efficacité (perte de poids, effet sur le diabète ou le taux de cholestérol par exemple) et la sécurité (dénutrition, carence en vitamine, reflux gastrique, cancer de l'oesophage) de cette intervention sur le long terme.

Un modèle expérimental de SGTB sera mis au point chez le rat afin d'évaluer son efficacité et ses effets positifs et négatifs et de les comparer à la chirurgie de référence RYGB.

Ce projet de recherche chirurgicale sur l'animal apportera des éléments positifs ou négatifs pour la validation d'une nouvelle intervention chirurgicale qui pourrait prendre une place fondamentale dans la discipline chirurgicale bariatrique en remplaçant à plus ou moins long terme le RYGB, la chirurgie de référence.

Les objectifs de ce projet sont doubles :

1.Élaboration d'un modèle animal sur le rat, fiable et reproductible de SGTB et analyse du transit par imagerie médicale de type IRM-PET (imagerie par résonance magnétique et tomographie par émission de positons) et euthanasie des animaux après 3 semaines pour analyser le tube digestif en détails.

2. Analyse des effets du SGTB (prise alimentaire, perte de poids, diabète) sur le très long-terme : 34 semaines de suivi (équivalent de plus de 20 ans chez l'homme), et comparaison aux résultats à des rats opérés de RYGB (intervention de référence) et à des rats opérés sans modification anatomique (rats contrôles). Les analyses seront réalisées de manière séquentielle à 6, 12, 24 et 32 semaines et les animaux euthanasiés à 8, 14, 26 et 34 semaines pour analyser le tube digestif en détail.

La règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) sera respectée.

Remplacement: l'élaboration et la mise à l'épreuve d'un modèle animal pour une nouvelle intervention chirurgicale sont essentielles pour prédire et comprendre les conséquences à long terme de l'intervention sur l'être humain.

Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu. De plus, le projet permettra de comprendre les communications entre les différents organes du corps en particulier les liens entre l'intestin qui absorbe les nutriments et le cerveau qui contrôle la prise alimentaire.

Raffinement : l'ensemble des procédures de ce projet se fera dans le respect du bien-être animal. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie générale et la prise en charge de la douleur est prévue avant, pendant et après l'opération. Nous avons inclus dans toutes les procédures des grilles de suivi de poids et de la prise alimentaire des animaux avec des pesées journalières les 15 jours après l'opération puis hebdomadaires et une grille d'évaluation de la douleur avec des points limites précis et adaptés. Tous les animaux sont euthanasiés en fin de procédure pour pouvoir étudier l'estomac et l'intestin en détails.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. Un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables. Lors de la phase de mise au point du projet un nombre minimum de 22 d'animaux (6 contrôles, 6 RYGB et 10 SGTB) est nécessaire

Puis dans la procédure principale 12 animaux par groupe sont nécessaires. Il y a 3 groupes (contrôles, RYGB et SGTB) et 4 temps d'analyse (8, 14, 26 et 34 semaines) nécessitant au total 144 animaux.

Au final, ce projet nécessitera l'utilisation de 166 rats sur 3 ans. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin du projet.

16460 De nombreuses substances chimiques sont peu solubles dans l'eau et nécessitent l'utilisation d'un solvant qui permettra leur solubilisation dans une solution aqueuse. Cette étape est indispensable pour pouvoir ensuite réaliser des études de toxicité *in vitro* et *in vivo*. Cependant, il est important de choisir le solvant le plus neutre possible afin qu'il n'interagisse pas avec le composé à étudier. Aussi, dans le cadre de l'évaluation de la génotoxicité *in vivo* du triacrylate de triméthylolpropane (TMPTA) dans le cadre du règlement Reach sur les substances chimiques, le sous-traitant a utilisé le polyéthylène glycol 400 (PEG-400) comme solvant avant administration intraveineuse chez la souris dans un test de génotoxicité. Les résultats se sont révélés négatifs, mais il n'est pas impossible que le solvant utilisé ait masqué la toxicité du TMPTA et induit un résultat faussement négatif dans ce test. Aussi, dans le cadre de cette saisine, nous envisageons d'étudier l'impact du solvant sur la réponse génotoxique du TMPTA en comparant le solvant Peg-400 et l'huile de maïs. Pour cela, des souris mâles recevront par gavage 3 administrations en 48h de TMPTA repris soit dans du Peg-400 soit dans de l'huile de maïs. Les animaux seront ensuite mis à mort pour récupérer des organes afin de réaliser les tests de génotoxicité. Le nombre d'animaux, 74, est réduit à son strict minimum. Un point limite a été défini et les animaux seront euthanasiés dès que ce point limite sera atteint. Cette étude requiert l'utilisation d'animaux, car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives suffisamment prédictives de la génotoxicité *in vivo*. De plus, des mesures de raffinement spécifiques seront mises en place pour améliorer le confort d'hébergement comme l'enrichissement du milieu (billes).

16461 Le projet présenté ici a pour objectif de permettre aux apprenants d'acquérir une formation en biologie fondamentale avec un enseignement approfondi en physiologie animale. La physiologie est par essence une discipline intégrative qui nécessite l'assimilation de connaissances faisant appel à une progression multi-échelle (des gènes à l'organisme) et intégrée (connexion entre les grands systèmes) afin de comprendre le fonctionnement des processus à l'échelle de l'organisme. Un des moyens d'acquérir et d'assimiler ces connaissances est d'illustrer ces concepts par une démarche expérimentale. Ce projet d'exploration fonctionnelle en Physiologie Animale s'inscrit dans cette démarche et permet de compléter l'approche cellulaire qui est dispensée aux apprenants durant leurs années universitaires. Ce projet se révèle donc être indispensable pour comprendre le concept de physiologie intégrée.

Ainsi, à l'issue de la réalisation des procédures composant ce projet, les compétences acquises par les apprenants sont d'ordre :

- Disciplinaire : meilleure compréhension des notions développées en cours en ce qui concerne la physiologie des fonctions cardio-vasculaire, respiratoire et rénale, des régulations nerveuses et

hormonales se produisant au niveau de l'organisme entier et de la coordination de ces fonctions dans le maintien de l'homéostasie ; rédaction de compte rendu scientifique, exploitation des données expérimentales, transposition de la théorie à la pratique, utilisation d'outils de traitement de données.

- Scientifique : acquisition d'une réflexion méthodologique basée sur l'expérience.

- Opérationnel : savoir manipuler les animaux par préhension et contention, savoir surveiller l'état des animaux, connaître une technique de prélèvement et d'injection ; savoir mesurer des paramètres physiologiques.

- Réglementaire : prise de conscience de la réglementation et de la notion d'éthique relative à l'expérimentation animale (notion d'être sensible, les 3R, notion de points limites).

Trois procédures sont incluses dans ce projet et se déclinent sous forme de 3 séances de travaux pratiques d'une durée de 5 h chacune. Une séance de travaux dirigés précède la réalisation des procédures et consiste à sensibiliser les apprenants à la notion d'éthique et à la réglementation en vigueur. Chacune des procédures est une procédure sans réveil au cours de laquelle est réalisée la cathétérisation de la veine jugulaire et de l'artère carotidienne, permettant par la suite d'analyser une grande fonction physiologique. Ainsi, la procédure 1 vise à initier les apprenants à la manipulation sur le rat avec mesure du volume plasmatique et sanguin. La procédure 2 consiste à étudier la physiologie cardiovasculaire et respiratoire (régulation hormonale de la pression artérielle et de la ventilation). La procédure 3 correspond à l'étude de la fonction rénale (diurèse, mesure de la filtration glomérulaire et de la clairance rénale au sodium, effet du furosémide).

Parce que l'exploration fonctionnelle des grandes fonctions rénale, respiratoire et cardiaque nécessite d'aborder les processus de régulation et d'intégration à l'échelle de l'organisme entier, aucune méthode de remplacement ne peut s'appliquer ici. De plus, ces processus font au préalable l'objet d'un enseignement théorique décrit principalement chez les mammifères. Dans ce contexte, le modèle rat est utilisé d'une part pour illustrer par la pratique ces processus et d'autre part, pour permettre aux apprenants de les assimiler. La plupart des logiciels de simulation existants décrivent les processus à l'échelle organotypique et cellulaire ne peuvent pas rendre compte des interactions de contrôle négatifs existants 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 dans son intégralité par expérimentation *in vivo*.

Dans un souci de réduction, les procédures sont réalisées en binômes. Le détail de ces gestes techniques est d'abord présenté aux apprenants sous forme d'une vidéo permettant ainsi de visualiser ces derniers et de compléter les informations disponibles sur le fascicule des travaux pratiques que possède chacun des apprenants. La présentation des gestes grâce à cette vidéo et au fascicule (vérification profondeur anesthésie, contention et tonte, dégagement de chacun des vaisseaux, pose cathéter, réalisation d'une injection et d'un prélèvement) permettent ainsi d'éviter un surplus d'utilisation d'animaux. Un encadrant est prévu pour 8 étudiants afin de dispenser un enseignement aussi personnalisé que possible avec une surveillance rapprochée de chaque animal.

En ce qui concerne le raffinement, une anesthésie générale combinée à l'utilisation d'un antalgique central et local est réalisée systématiquement et les signes vitaux sont en permanence surveillés par les apprenants. L'hypothermie est réduite au maximum en utilisant un dispositif réduisant les déperditions thermiques. Enfin, ce projet utilise des animaux réformés fournis par un organisme agréé et issus d'une même souche permettant de standardiser les procédures.

Le nombre de rats utilisés est calculé afin de tenir compte de la nécessité de réduction et de l'exigence d'un enseignement de qualité (0,5 rats/participant soit 1025 rats en 5 ans).

16462 Les immunosuppresseurs sont actuellement les seuls médicaments pour éviter le rejet d'allogreffe. Cependant, ils ne sont pas spécifiques, diminuant l'ensemble des défenses immunitaires comme la réponse aux infections et permettant l'émergence de cancers, et peuvent être toxiques pour l'organe greffé. Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont une alternative à ces traitements. Etant donné leur spécificité d'action et leur efficacité de régulation de la réponse immune contre le greffon, des essais cliniques sont en cours pour évaluer leur potentiel thérapeutique. Ces essais cliniques utilisent des

Lymphocytes T CD4+ (LT CD4+). Nous avons fait la preuve de concept dans des modèles de greffe cardiaque chez le rat, des modèles de GvHD (Graft-versus-Host Disease) et de greffe de peau humaine chez la souris humanisée NSG, que les LT CD8+ sont au moins aussi efficaces que les LT CD4+. Un essai clinique de phase I est prévu en 2023 pour évaluer la toxicité des cellules CD8+ chez l'Homme. Les cellules produites jusqu'à aujourd'hui étaient cultivées en conditions de laboratoire de recherche et non de grade clinique. Nous devons maintenant valider que les changements de conditions de culture n'affectent pas (ou améliorent) leur capacité thérapeutique. L'objectif de ce protocole est d'évaluer les propriétés thérapeutiques des LTregs CD8+ produites en conditions de grade clinique, en transplantation, dans un modèle de réaction du greffon contre l'hôte (GvH) et de greffe de peau humaine chez la souris NSG et de définir le protocole qui sera utilisé pour les patients. Ces deux modèles de transplantation ont été mis au point au laboratoire et fonctionnent. Le modèle de transplantation de peau consiste à greffer 1cm² de peau humaine (issue d'un déchet de chirurgie réparatrice) sur le dos de la souris immunodéficiente NSG, puis un mois plus tard après cicatrisation, à injecter des PBMCs humains (Cellules Mononucléaires Périphériques Sanguines). Le rejet de greffe intervient en 30 jours environ. Le modèle de GvHD consiste à irradier en dose sous létale la souris NSG, puis à injecter des PBMCs humains. La réaction xénogénique contre la souris (permise par l'irradiation) se caractérise par une perte progressive de 20% (point limite) du poids de la souris en environ 14 jours. Nous co-injecterons dans ces deux modèles les LTregs CD8+ avec les PBMCs, puis scorerons le rejet de peau et la GvHD pour définir l'efficacité du traitement et l'éventuelle toxicité. Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit : - Remplacer : Les études fonctionnelles *in vitro* sont limitées par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études *in vivo*. La preuve de concept a été faite dans ces modèles de souris NSG, et l'impact des modifications de production des cellules indispensables pour leur utilisation en clinique doit être comparé dans le même modèle. Ces modèles de souris NSG avaient été choisis en remplacement de modèles primates non humains, et sont plus pertinents (test direct de cellules humaines et non de cellules de primates non humains). - Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 10, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Ces tests statistiques comparent les souris traitées par rapport à des souris contrôle positif de GvHD ou de rejet d'allogreffe selon le modèle utilisé. Le test Two Way RM ANOVA évalue la perte de poids au cours du temps ainsi que la survie du greffon au cours du temps. Le Log Rank test évalue les courbes de survie). 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 320. - Raffiner : Toutes les souris seront hébergées au maximum par 5, dans des cages ventilées aux normes, avec à disposition de formes d'enrichissements (Sizzle nest, tube, dome) afin de réduire leur stress. Dans tous les protocoles mis en oeuvre, les petites interventions invasives seront effectuées sous anesthésie gazeuse (prélèvements de sang, injections des cellules dans la veine de la queue...). Les interventions chirurgicales plus longues seront effectuées sous anesthésie générale fixe (mélange de Kétamine 80mg/kg + Xylazine 10mg/kg en IP (volume maximal : 500µl)), associée à une analgésie pré et post-opératoire (Buprénorphine à 0.05mg/kg en SC (volume maximal : 100µl)). Durant ces interventions chirurgicales, les souris seront placées de l'endormissement jusqu'au réveil total sur un tapis chauffant et surveillées pendant tout ce temps. Elles recevront avant l'opération une injection de 200µl de solution saline réchauffée à 37°C pour parer à une déshydratation de l'animal. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, leur comportement, leur intégrité, le développement d'une GvHD et/ou un rejet de greffe. En absence de maladie, les souris seront suivies tous les 2 jours, puis quotidiennement dès l'apparition des premiers symptômes. Un score clinique sera établi en fonction de la perte de poids et des signes cliniques caractéristiques d'un mal-être (changement de posture, d'activité, d'aspect du poil, d'état général) selon un tableau des points limites. Lorsque 3 signes cliniques notables ou 1 seul signe clinique sévère seront observés, ou que lorsque les animaux auront perdu 20% de leur poids initial, les animaux seront euthanasiés par inhalation d'isoflurane en surdose (5%/l d'air) puis dislocation cervicale. En l'absence de points limites, ceux-ci seront euthanasiés au bout de 100 jours après l'injection des cellules. 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 les cellules régulatrices et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'informations 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 définir les conditions de culture optimales des LTregs CD8+ les plus efficaces à administrer chez le patient dans le cadre de l'essai clinique européen prévu en 2023 et sont indispensables pour l'approbation de l'ANSM.

16463 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), appelée aussi Maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative touchant spécifiquement des neurones, appelés motoneurones, qui innervent les muscles. La maladie se déclare à l'âge adulte, elle provoque la paralysie du patient et son issue est fatale. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif. La découverte d'un lien génétique chez certains patients a permis de développer plusieurs modèles murins de la SLA. S'il est clair que l'introduction d'un gène humain muté dans ces souris provoque la maladie, les mécanismes conduisant à la dégénérescence spécifique des motoneurones restent quant à eux inconnus. Il a toutefois été montré que la dégénérescence des motoneurones est due à des interactions complexes avec les muscles mais aussi avec plusieurs types cellulaires (neurones, cellules gliales) dans le système nerveux. Comme cette étude concerne les effets d'une molécule agissant sur les cellules gliales des motoneurones, il est primordial d'étudier les motoneurones *in vivo* sur l'animal, c'est à dire dans leur environnement normal, plutôt qu'en culture *in vitro*. Il n'y a donc pas, pour ce projet, d'alternative à l'utilisation d'animaux.

L'étiologie de la SLA comprend une composante inflammatoire très importante. La molécule PY a une action très puissante sur l'inflammation, et l'administration de la molécule PY a montré des effets bénéfiques spectaculaires sur des souris modèles de maladies inflammatoires (goutte, polyarthrite rhumatoïde). Le but de ce projet est d'établir si la molécule PY a aussi un effet bénéfique sur le phénotype de souris modèles de la SLA (souris SOD1 G93A).

Le projet sera réalisé sur des souris adultes. La molécule sera administrée dans l'eau de boisson, disponible ad libitum, en démarrant le traitement au stade présymptomatique (30 jours après la naissance). L'évolution du phénotype sera appréciée d'après l'évolution du poids de l'animal, sa capacité à agripper une grille métallique calibrée, et un score clinique. L'expérience sera arrêtée lorsque les animaux passeront du score clinique 2 au score 3 (sur une grille de score comportant 4 niveaux). Lors de l'arrêt de l'expérience les animaux présentent uniquement des symptômes modérés avec peu d'impact sur leur vie.

Le projet a été conçu pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés en permettant d'obtenir le plus d'informations possibles sur chaque animal. Au total, le nombre de souris utilisées sera de 48 sur une durée de 3 ans. Cet effectif est nécessaire pour permettre des comparaisons statistiquement valides. Les animaux disposeront d'un igloo dans leur cage pour enrichir leur environnement. Une surveillance quotidienne permettra de vérifier que les animaux ne présentent aucun signe de souffrance, ce qui entraînerait leur mise à mort anticipée.

A terme, si un effet bénéfique de la molécule PY était avérée sur la souris, un essai clinique pourrait être envisagé chez les patients humains atteints de la maladie de Charcot.

16464 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une maladie fréquente en France et grave. 80% des AVC sont dus à des accidents ischémiques consécutifs à l'occlusion d'une artère intracrânienne par un caillot sanguin provenant de la circulation ou formé *in situ*. Les conséquences d'un AVC sont sévères puisqu'un quart des patients en décèdent et un autre quart finit par développer une démence. Un traitement efficace validé aujourd'hui, repose sur la recanalisation du vaisseau par thrombolyse avec l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (tPA). Ce traitement consiste à injecter par voie intraveineuse le tPA qui est une substance capable de dissoudre le caillot qui bouche l'artère du cerveau et cause l'AVC. Il est associé ou non à une thrombectomie cérébrale mécanique qui est une technique médicale qui consiste à piquer dans l'artère fémorale, remonter par les artères jusqu'au vaisseau du cerveau bouché pour aller récupérer le caillot que l'on retire ensuite avec un dispositif médical. Mais ce traitement présente plusieurs limites qui nous conduisent à mener ce projet : il ne peut être effectué que dans une fenêtre temporelle étroite c'est à dire 4h30 après le début des symptômes. Il est contre indiqué pour les patients âgés ou des patients présentant des risques

hémorragiques. Par ailleurs la thrombectomie est un acte hyperspécialisé difficilement accessible en urgence à l'ensemble de la population. Face à un tel problème de santé, il est donc important de comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'AVC ischémique afin d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques. Notre objectif est de montrer l'implication de l'équilibre entre les enzymes qui clivent les protéines (appelées protéases) et les protéines qui inhibent ces protéases (appelées antiprotéases), sur le développement des lésions cérébrales, lors de l'ischémie et de la reperfusion. Pour cela, nous utiliserons des modèles d'AVC ischémique induit par une occlusion transitoire ou permanente, réalisée sous anesthésie et analgésie, d'une artère cérébrale chez des souris transgéniques sans caractères dommageables. Les souris seront soumises à une ischémie cérébrale via une procédure chirurgicale bien établie au laboratoire, suivi d'une surveillance post-opératoire (6h après la chirurgie). Les souris seront euthanasiées en fin de procédure et le sang et les tissus seront prélevés et stockés pour les analyses biologiques. Ce projet nécessite 800 souris 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 et le fait que certaines procédures impossibles à faire chez le même animal, imposent des groupes d'animaux différents. La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte de l'impact de la balance entre protéases et antiprotéases après ischémie cérébrale au cours du temps. Ce modèle d'AVC n'est à ce jour pas remplaçable. 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, de façon journalière par l'animalier et bi-hebdomadaire par l'expérimentateur. 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.

16465 La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est le cancer le plus fréquent chez les enfants, représentant environ 30 % de toutes les tumeurs malignes infantiles et 80% des leucémies pédiatriques. Bien que des progrès importants aient permis d'améliorer considérablement leur pronostic, environ 20 % des enfants nouvellement diagnostiqués connaissent un échec du traitement ou bien une rechute et parmi eux moins de 50% seront guéris malgré un traitement intensif. Des efforts supplémentaires sont donc essentiels pour améliorer la survie des patients à haut risque et de nouvelles options thérapeutiques sont nécessaires.

Depuis de nombreuses années, les techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence de nombreuses anomalies dont certaines peuvent être une cible thérapeutique pour de nouvelles molécules. C'est le cas notamment des anomalies de deux gènes qui participent au processus de leucémogénèse et sont plus largement impliqués dans la multiplication des cellules cancéreuses. Il a été démontré dans le cadre d'essais cliniques développés pour des adultes souffrant de cancer du sein que des médicaments permettant de cibler ces deux gènes avaient une efficacité contre la prolifération des cellules cancéreuses.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'effet de tels médicaments, en association ou non, sur la multiplication et la survie des cellules leucémiques *in vivo* en utilisant des modèles murins.

Nous aurons besoin pour réaliser l'ensemble de nos expériences de 920 souris immunodéficientes sur 3 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 ces gènes dans la tumorigénicité des cellules leucémiques. 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 : Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. La croissance tumorale des cellules greffées sera suivie de manière longitudinale tout au long de l'expérience ce 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, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt).

16466 L'ostéosarcome (OS) est la tumeur osseuse maligne primitive la plus fréquente chez l'enfant et l'adulte représentant 40-60% des cas, troisième cause de cancer chez l'enfant. L'ostéosarcome des mâchoires (OS-M) représente 5 à 10% des ostéosarcomes et touche principalement la mandibule. Contrairement aux OS des os longs, il se distingue par un développement en dehors de la phase de croissance pubertaire (âge médian : 35 ans), un développement métastatique plus précocité (20% à 2 ans) et un taux de survie supérieur (77% à 5 ans). Malgré ces chiffres, la prise en charge des patients demeure tardive, la localisation anatomique rend la chirurgie lourde et handicapante pour les patients et enfin la récurrence locale atteint 50%.

L'absence de mutation pathognomonique, la rareté de la maladie et la grande hétérogénéité intra- et inter-tumorale de l'ostéosarcome justifient l'étude du microenvironnement tumoral à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, actuellement aucun modèle animal spécifique de l'ostéosarcome des mâchoires n'est décrit.

La sélection de nouvelles molécules repose notamment sur leur efficacité anti-tumorale *in vitro* et dans des modèles précliniques de xénogreffes. Dans ce cas ce sont des lignées cellulaires qui sont injectées dans des souris immunodéprimées afin d'y développer une tumeur dans un environnement approprié et d'évaluer l'activité de ces molécules. Néanmoins l'efficacité anti-tumorale de ces molécules dans ces modèles expérimentaux et sur les tumeurs des patients est souvent faiblement corrélée. L'environnement de la tumeur provient d'une espèce différente ce qui affecte la composition cellulaire de la tumeur, mais surtout la structure 3D et l'hétérogénéité caractéristique de la pathologie sont absentes avec l'utilisation de lignées tumorales.

L'amélioration de la valeur prédictive de ces modèles précliniques peut-être obtenue grâce à des modèles de xénogreffe dérivée de la tumeur du patient (appelé patient-derived xenograft – PDX). Dans ce cas un fragment tumoral provenant du patient est greffé dans les plus brefs délais chez une souris immunodéprimée. De plus, lorsque la tumeur est implantée de manière orthotopique (mandibule) , ces PDX permettent parfois de mimer la dissémination métastatique de la maladie. Pour ces raisons un effort collectif est actuellement en cours afin de générer un panel représentatif de PDX pour chaque (sous-) type de cancer.

Le projet porte sur le développement de nouveaux modèles murins d'ostéosarcomes de mâchoires. Dans un premier temps, les animaux seront greffés à partir d'un fragment de tumeur du patient afin d'établir de nouveaux modèles. Par la suite, l'objectif sera de comparer les ostéosarcomes en fonction des sites de localisation (os longs vs mâchoires).

Le projet nécessite un total de 115 souris. 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 analgésie adaptée, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

16467 Limiter l'impact environnemental de l'élevage avicole tout en maintenant la rentabilité économique implique de disposer d'animaux capables de valoriser efficacement tous les éléments de leur ration, en particulier les ressources rares ou mal assimilées que sont les minéraux (P, Ca...). Le phosphore en particulier est un élément de la ration dont l'impact environnemental est très élevé et qui, en outre, repose sur l'utilisation d'une ressource naturelle rare. L'objectif du projet est donc d'étudier le déterminisme génétique de la capacité du poulet à valoriser ces ressources afin de les améliorer.

Pour ce faire, nous élèverons 320 poulets de chair pendant 7 semaines. Les animaux seront élevés au sol et en groupe, dans des conditions proches de celles trouvées en élevage. Les animaux seront équipés de puces électroniques afin de pouvoir enregistrer en continu leur consommation alimentaire et leur croissance et donc de connaître leur consommation de phosphore et leur efficacité alimentaire. Une prise de sang sera effectuée sur tous les animaux, à 7 semaines, peu avant la mise à mort, afin de rechercher des paramètres sanguins de la capacité à digérer le phosphore. A l'issue de la prise de sang, les animaux seront euthanasiés pour prélever le contenu intestinal sur lequel la digestibilité du phosphore pourra être mesurée.

Respect de la règle des 3R:

- Remplacer : pour évaluer les possibilités de sélection de l'efficacité à digérer le phosphore chez le poulet, il nous faut disposer de ces mesures et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même
- Réduire : des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaires à cette expérience.
- Raffiner : Le calme et une contention soignée pendant la prise de sang seront mis en oeuvre. Pour le reste, les poulets seront élevés dans des conditions standard, au sol sur copeaux, en groupe et auront accès à l'aliment, l'eau de boisson ad libitum et la possibilité d'explorer des objets divers (billes, perchoirs). Ils seront visités deux fois par jour.

16468 Le cœur est le premier organe à être formé et à fonctionner chez l'embryon. Une malformation cardiaque entraîne généralement une mort très tôt au cours du développement. Il apparaît donc comme indispensable de comprendre comment le cœur est formé et quels sont les acteurs essentiels à son développement. C'est dans ce cadre que notre projet s'inscrit puisqu'il a pour but de déterminer le rôle d'une protéine dans le développement cardiaque dont l'absence entraîne une mort prématurée de l'embryon. Cette mort est probablement due aux malformations cardiaques sévères observées comme par exemple des parois ventriculaires très fines.

Dans le but de comprendre pourquoi l'absence de notre protéine d'intérêt conduit à des malformations cardiaques, nous travaillons sur un modèle de souris ne possédant pas cette protéine ce qui nous permettra de mieux déterminer son rôle.

Pour cela, nous utiliserons 148 souris adultes sur une période de cinq ans. Ces souris permettront entre autre de générer les 48 embryons nécessaires à notre étude. En effet, nous réaliserons des accouplements contrôlés afin de savoir exactement le stade de développement des embryons. A la suite de quoi, nous réaliserons des échographies afin de suivre la gestation et de déterminer à quel stade la perte d'expression de notre protéine est létale. Durant cette analyse, les animaux seront placés sous anesthésie générale de manière à éviter le sacrifice séquentiel d'animaux. Nous analyserons également les fonctions cardiaques des embryons dans le but de déterminer si l'absence de notre protéine d'intérêt altère les fonctions cardiaques des embryons et pourrait être la cause de la létalité précoce observée.

Le développement du cœur chez les mammifères est un processus complexe qui nécessite la communication entre les cellules du cœur et les autres types cellulaires qui les entourent. Ce dialogue entre les cardiomyocytes (CM) et leur environnement n'est actuellement pas reproductible *ex vivo*. Il n'est donc pas possible de remplacer l'utilisation du modèle souris par un modèle uniquement de culture cellulaire. Cependant, la culture de cellules cardiaques sera privilégiée dès que possible, dans le but de répondre à des questions mécanistiques par exemple.

Les animaux sont placés en cage d'hébergement enrichie en coton de manière à ce qu'ils fassent un nid. De plus, au cours de nos expériences, nous avons également mis en place des points limites dans le but d'identifier rapidement si l'animal est en souffrance afin de le sacrifier le cas échéant.

Ce projet nous permettra donc de comprendre le rôle de notre protéine d'intérêt dans le développement du cœur ainsi que dans ses fonctions tout au long de la vie.

16469 Le cœur est le premier organe à être formé et à fonctionner chez l'embryon. Une malformation cardiaque entraîne généralement une mort très tôt au cours du développement. Il apparaît donc comme indispensable de comprendre comment le cœur est formé et quels sont les acteurs essentiels à son développement. C'est dans ce cadre que notre projet s'inscrit puisqu'il a pour but de déterminer le rôle d'une protéine dans le développement cardiaque dont l'absence entraîne une mort prématurée de l'embryon. Cette mort est probablement due aux malformations cardiaques sévères observées comme par exemple des parois ventriculaires très fines.

Dans le but de comprendre pourquoi l'absence de notre protéine d'intérêt conduit à des malformations cardiaques, nous travaillons sur un modèle de souris ne possédant pas cette protéine ce qui nous permettra de mieux déterminer son rôle.

Pour cela, nous utiliserons 148 souris adultes sur une période de cinq ans. Ces souris permettront entre autre de générer les 48 embryons nécessaires à notre étude. En effet, nous réaliserons des accouplements contrôlés afin de savoir exactement le stade de développement des embryons. A la suite de quoi, nous réaliserons des échographies afin de suivre la gestation et de déterminer à quel stade la perte d'expression de notre protéine est létale. Durant cette analyse, les animaux seront placés sous anesthésie générale de manière à éviter le sacrifice séquentiel d'animaux. Nous analyserons également les fonctions cardiaques des embryons dans le but de déterminer si l'absence de notre protéine d'intérêt altère les fonctions cardiaques des embryons et pourrait être la cause de la létalité précoce observée.

Le développement du cœur chez les mammifères est un processus complexe qui nécessite la communication entre les cellules du cœur et les autres types cellulaires qui les entourent. Ce dialogue entre les cardiomyocytes (CM) et leur environnement n'est actuellement pas reproductible *ex vivo*. Il n'est donc pas possible de remplacer l'utilisation du modèle souris par un modèle uniquement de culture cellulaire. Cependant, la culture de cellules cardiaques sera privilégiée dès que possible, dans le but de répondre à des questions mécanistiques par exemple.

Les animaux sont placés en cage d'hébergement enrichie en coton de manière à ce qu'ils fassent un nid. De plus, au cours de nos expériences, nous avons également mis en place des points limites dans le but d'identifier rapidement si l'animal est en souffrance afin de le sacrifier le cas échéant.

Ce projet nous permettra donc de comprendre le rôle de notre protéine d'intérêt dans le développement du cœur ainsi que dans ses fonctions tout au long de la vie.

16470 Notre objectif est de fournir aux chirurgiens oncologues une technique innovante d'imagerie médicale, et d'aide à l'acte chirurgical en temps réel : l'ImmunoPhotoDetection (IPD) alliant la spécificité des anticorps monoclonaux anti-tumeur à la sensibilité de la détection par fluorescence. Le conjugué (anticorps couplé au fluorochrome) dirigé sélectivement vers les cellules tumorales est injecté au patient, et 24 à 48 heures après, le chirurgien opère et retire les nodules tumoraux visibles à l'oeil nu. Il peut ensuite éclairer le champ opératoire avec une sonde optique spécifique pour visualiser les nodules de petite taille (< 10 mg) fluorescents et les enlever. Cette technique permettra de diminuer les récurrences.

Le Récepteur de l'Hormone Anti-Mullérienne de type II (AMHRII) est très présent dans les tumeurs d'origines ovariennes. Nous avons développé un anticorps reconnaissant très bien ce récepteur *in vitro* et nous avons plusieurs conjugués avec différents ratios anticorps/fluorochrome. Nous avons besoin de procéder à une étude chez l'animal pour montrer l'efficacité et la faisabilité *in vivo* de cette technique, la biodistribution et les voies d'élimination du conjugué, et son bon adressage aux cellules tumorales avant le passage chez l'Homme. Pour cela, il reste à définir le ratio de conjugaison anticorps-fluorochrome optimal, la dose optimale de conjugué à injecter, le délai optimal entre l'injection du conjugué et l'observation en IPD, et d'évaluer la cinétique et les voies d'élimination du conjugué dans des modèles murins auxquels seront greffés des tumeurs ovariennes en sous-cutané, en orthotopiques dans l'ovaire (tumeurs primaires) et en intrapéritonéale (carcinomes péritonéales). Nous utiliserons des souris immunodéprimées (NMRI Nude) car historiquement les premières études réalisées ont été faites sur cette espèce et les données déjà recueillies nous permettront d'optimiser le nombre d'animaux et les temps de croissance tumorale.

Il faudra également tester les sondes optiques utilisables en IPD, en fonction de leurs disponibilités sur le marché afin de prouver que les résultats ne seront pas appareillage-dépendant. Au maximum 10 sondes seront testées.

Finalement, préalablement aux études de toxicologie réglementaire, une étude de toxicité combinée à une mesure de Pharmacocinétique (dosage en ELISA) du conjugué sera réalisée en injectant plusieurs doses du conjugué à des souris présentant ou non des tumeurs exprimant la cible du conjugué.

Dans l'esprit de la règle des 3R :

* Toutes les expériences décrites seront faites avec des conjugués préalablement évalués *in vitro*. Mais le modèle animal est indispensable à la validation des conjugués et de la technique dans des conditions les plus proches possibles de l'utilisation chez l'Homme pour chacun des types de tumeurs visées (tumeur primaire ou carcinose péritonéale). De plus, les études préliminaires de toxicologie sont nécessaires à la réalisation de l'étude de toxicologie (obligatoire pour une demande d'essais cliniques) dans des conditions optimales en termes de nombre d'animaux.

* Le nombre d'animaux sera réduit car des expérimentations précédentes (première étude, sous une autre demande d'autorisation) ont permis la mise au point de protocoles de greffes optimaux et ont montrés 100% de prise de greffe. De plus, les modèles de greffe utilisés sont parfaitement documentés dans la littérature, nous avons donc pu déterminer le nombre optimal d'animaux par condition pour obtenir des tumeurs exploitables en nombre suffisant et des résultats représentatifs. Finalement, lorsque cela est possible nous rassemblerons l'étude de plusieurs paramètres sur une seule expérience, comme le suivi de la cinétique d'adressage en même temps que la biodistribution à une tumeur en sous—cutané, dans l'optique de ne pas multiplier le nombre d'animaux utilisés.

* Pour le bien-être animal, à leur arrivée au sein de l'animalerie les souris seront laissées une semaine sans manipulation pour les habituer à leur nouvel environnement. Elles seront surveillées quotidiennement par l'équipe de zootechniciens de l'animalerie qui les héberge, en plus du suivi au moins 3 fois par semaine par nos soins à partir des premiers actes (par exemple : greffes). Dans chaque cage seront placés des copeaux de papier pour que les souris puissent se faire un nid où se réfugier et/ou des jeux en plastiques autoclavables, en accord avec la réglementation et le fonctionnement de l'animalerie.

Tous les expérimentateurs intervenant sur les animaux sont à jour dans leurs formations les autorisant à expérimenter.

Pour éviter la souffrance animale, les modèles de greffes utilisés (SC, IP) sont fréquemment utilisés à l'animalerie, ils sont donc parfaitement maîtrisés sur le plan technique. Pour la chirurgie, un protocole anesthésie/analgésie sera pratiqué pour limiter au maximum la souffrance et les douleurs en pré, per et post-opératoire, et les manipulateurs ont suivi une formation spécifique leur autorisant la pratique de chirurgie animale.

Toutes les expériences que nous pratiquerons sur les souris suivront les recommandations du Gircor (Guide l'évaluation éthique), la « Charte pour une éthique de l'expérimentation animale » et le « Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research » (Workman et al ; British Journal of Cancer ; 2010) pour la définition des points limites. Pour réaliser le suivi de ces points limites, nous utiliserons une grille des signes cliniques à observer chez la souris établie par l'animalerie hébergeant nos souris. Dès qu'un animal atteindra un des points limites défini, il sera automatiquement sacrifié par asphyxie gazeuse au CO₂.

L'ensemble des expérimentations nécessitera l'utilisation de 432 souris.

16471 Une douleur qui dure plus de trois mois est définie comme chronique et en tant que telle représente un des problèmes de santé publique les plus importants dans les pays développés. Les douleurs chroniques affectent environ 20% de la population adulte, et sont pour la plupart résistantes aux traitements thérapeutiques actuels. En effet, plus des 2/3 des patients souffrant de douleurs chroniques sont mal contrôlés par les médicaments actuels. Cela est essentiellement dû à notre méconnaissance des mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la chronicisation douloureuse, ce qui empêche le développement de nouvelles thérapeutiques. De plus, il existe une comorbidité entre douleur chronique, et un état anxiodépressif chez de nombreux patients. Par ailleurs l'utilisation de la morphine,

molécule de référence pour le traitement de la douleur, est limitée en raison de l'apparition d'effets secondaires et de phénomènes de tolérance. Notre projet s'intéresse donc à la caractérisation des mécanismes responsables de la douleur chronique, au niveau sensoriel et émotionnel. Les effets pharmacologiques des molécules utilisées et les effets des différentes stratégies de déletion de FLT3 dans la chronicisation douloureuse, l'analgésie et l'état émotionnel, doivent être évalués au travers de systèmes intégrés par différents tests comportementaux, qui viennent appuyer et confirmer les données obtenues par des approches cellulaires. Il est donc indispensable d'avoir recours à des investigations sur l'animal afin de proposer des alternatives thérapeutiques pour une amélioration de la prise en charge de la douleur. Au niveau pré-clinique, différents modèles d'étude de douleurs chroniques existent déjà et seront utilisés dans ce projet : modèles de douleur post-opératoire, neuropathiques, inflammatoires, ou faisant suite à un traitement chronique à la morphine. De façon plus précise, l'implication d'une nouvelle cible innovante dans la douleur, le récepteur FLT3, sera étudiée. Pour cela, différentes lignées de souris génétiquement modifiées seront utilisées. Le comportement douloureux des animaux sera effectué en utilisant des tests classiques de nociception, et un suivi de l'état émotionnel sera effectué en utilisant des tests classiques d'anxio-dépression. Le nombre maximum estimé de souris sera de 4004 sur 5 ans. Afin de répondre à la règle des 3R, une habituation de minimum une semaine est réalisée au cours de laquelle les animaux sont placés dans la pièce expérimentale pendant minimum 1h, puis exposés aux différents tests sans appliquer de stimulus nociceptif. Cela permet aux animaux de s'habituer à l'environnement et à l'expérimentateur, ce qui limite l'impact du stress lié à la procédure expérimentale. Cette période d'habituation est fondamentale afin d'assurer une reproductibilité des tests nociceptifs, de limiter l'angoisse et stress des animaux assurant alors une meilleure homogénéité dans les différents lots expérimentaux. Ceci nous permet donc également de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, les animaux sont stabulés en cage collective (10 souris/cage) dans une animalerie dans laquelle la température et l'hygrométrie sont contrôlées. Les locaux sont en légères sur-pression, les cages possèdent des couvercles filtrants, et les animaux bénéficient d'un enrichissement du milieu (copeaux, igloos en plastique, bâtonnets de cellulose). Enfin, afin de limiter l'usage de modèles animaux, un modèle *in vitro* HEK 293T où FLT3 est surexprimé sera utilisé en parallèle. Ce modèle permettra d'étudier les voies de signalisation et mécanismes engagés par FLT3 dans les mécanismes de chronicisation douloureuse de manière complémentaire et de façon à remplacer dans la mesure du possible l'emploi de modèles *in vivo*.

16472 Le poney Welsh est un poney originaire du Pays de Galles. C'est une race rustique adaptée à un environnement difficile, capable de supporter des climats rigoureux et de survivre avec de très maigres rations. La richesse de l'alimentation apportée à ces poneys dans nos élevages français n'est donc pas forcément bien adaptée à leur génétique. Cette situation est cause d'obésité chez nos poneys et nous pensons que cet état est aussi responsable de tout un ensemble de dérégulations métaboliques ayant une influence sur la reproduction des juments mais aussi sur l'occurrence d'autres pathologies (résistance à l'insuline causant une forme de diabète ; dysfonctionnements mitochondriaux dans le muscle squelettique...). Autres conséquences du surpoids, nos poneys présentent des anomalies de la locomotion (boiteries, fourbures) dont on sait qu'elles sont dépendantes du poids de l'animal mais aussi de l'alimentation. Le poney Welsh est donc un très bon modèle d'étude de toutes les pathologies liées à l'obésité.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des anomalies associées à cet état d'engraissement exagéré de nos juments, nous proposons de mettre en place une étude métabolomique du plasma et du tissu adipeux de 20 juments. Les 20 ponettes Welsh ont été sélectionnées en fonction de leur aptitude déviante dans la croissance du tissu adipeux sous-cutané en présence d'un environnement riche (résultats antérieurs provenant du suivi de la croissance du tissu adipeux par échographie lors des saisons 2012 à 2014). Ce groupe de 20 ponettes représente donc un panel varié représentatif de la population de l'élevage avec des cinétiques de croissance du tissu adipeux différentes, ce qui devrait nous permettre d'établir des corrélations intéressantes entre les nombreux indicateurs de l'étude.

Réduction : initialement prévu avec 40 juments, ce protocole sera finalement réalisé avec 20 animaux suivis par échographie depuis 2012 et représentatifs de la population entière de l'élevage.

Raffinement : tout a été fait pour limiter l'invasivité du protocole. La majorité des indicateurs biologiques suivis sont non invasifs excepté une prise de sang mensuelle et deux biopsies prévues avant et en cours d'étude. De plus, ce suivi privilégié des 20 juments de ce protocole permettra de prévenir les risques de fourbures que nous rencontrons chaque année sur une partie de l'effectif animal.

Remplacement : comme expliqué ci-dessus, le poney Welsh est un modèle irremplaçable pour l'étude des facteurs associés à l'obésité, facteurs rassemblés chez le cheval sous l'appellation "syndrome métabolique équin".

16473 La connectivité cérébrale est l'ensemble des connexions existant entre les différentes aires du cerveau, le connectome étant la cartographie de ces connexions, qui est généralement établie à partir de méthodes de neuroimagerie comme l'IRM. La connectivité est un processus dynamique évoluant au cours de la vie (développement cérébral, apprentissage, vieillissement). La connectivité cérébrale est altérée dans un grand nombre de pathologies comme l'épilepsie, la sclérose en plaques, la schizophrénie, l'autisme ou la maladie d'Alzheimer. Une meilleure connaissance des relations entre connectome structural, autrement dit le circuit de connexions physiques constitué de faisceaux de substance blanche reliant les différentes aires cérébrales, et le connectome fonctionnel qui est la cartographie de l'activation neuronale dans les différentes régions cérébrales permettrait de mieux comprendre l'impact de certaines lésions sur le fonctionnement cérébral. Elle contribuerait aussi à l'amélioration des stratégies thérapeutiques, comme dans le cas de la chirurgie de l'épilepsie grâce à une meilleure modélisation de la genèse et de la propagation des crises, ce qui permettrait de mieux cibler les zones de résection. Le but de ce projet pilote est d'étudier chez la souris saine les relations entre connectome structural et fonctionnel. Dans ce but, les animaux auront une IRM cérébrale sous anesthésie légère qui servira à établir le connectome structural grâce à l'imagerie du tenseur de diffusion et fonctionnel grâce à l'IRM fonctionnelle de repos. Les données obtenues sur les animaux des deux sexes permettront d'étudier les relations entre les deux connectomes. Nous utiliserons la plateforme neuroinformatique de simulation TVB (The Virtual Brain) qui établit des prédictions personnalisées du connectome fonctionnel à partir du connectome structural obtenu par IRM. Le connectome fonctionnel prédit par TVB sera ensuite comparé au connectome fonctionnel obtenu expérimentalement par imagerie. Les résultats permettront de vérifier les prédictions de TVB. Les résultats obtenus dans cette étude permettront d'optimiser TVB pour le cerveau de souris et serviront de base à de nouvelles études visant à tester l'impact de lésions du connectome structural sur le connectome fonctionnel dans des modèles d'épilepsie et l'effet de thérapies visant à modifier le connectome structural. Les résultats de ce projet seront transférables à l'homme, la plateforme neuroinformatique TVB étant déjà utilisée en neuropathologie humaine. Ce projet nécessitera l'utilisation de 24 souris adultes sur 12 mois. Les animaux seront explorés sur un spectromètre imageur préclinique dédié à la souris. Cette étude sera conduite dans le respect du principe éthique des 3R. Le recours à l'animal étant incontournable, nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum grâce à l'utilisation de méthodes d'imagerie non-invasives permettant le suivi longitudinal d'un même animal et l'emploi de tests statistiques pour le calcul de la taille des effectifs. Le raffinement concernera la diminution du stress par l'utilisation d'une anesthésie légère. Un délai d'acclimatation minimum de 10 jours et une habitude à l'expérimentateur seront 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.

16474 Les mammifères sont soumis à des cycles d'alternance de trois états de vigilance : l'éveil, le sommeil lent et le sommeil paradoxal. Le passage de l'un de ces états à un autre nécessite la mise en jeu de différents réseaux neuronaux, impliquant notamment le noyau préoptique ventrolatéral (VLPO) de l'hypothalamus pour le déclenchement et le maintien du sommeil lent.

Toutefois, bien que le sommeil soit un processus biologique universel et essentiel à la vie, les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu pendant le sommeil lent au sein du VLPO restent encore méconnus et représentent un défi majeur pour les neurosciences modernes. En effet, les

troubles du sommeil touchent encore 30 % de la population française et favoriseraient l'apparition de nombreuses pathologies telles que l'hypertension artérielle, le diabète, la dépression ou encore les accidents vasculaires cérébraux.

La régulation du sommeil fait intervenir deux processus : l'un dit homéostatique (induits par une accumulation de facteurs hypnogènes au cours de l'éveil) et l'autre dit circadien (régé par l'horloge centrale interne). Afin de déterminer si les modifications de l'expression moléculaire et de la morphologie des cellules du VLPO, qui participeraient à la régulation du sommeil lent, sont régulées par des mécanismes de régulation homéostatique ou circadien, nous réaliserons tout d'abord dans ce projet des expériences de privation de sommeil. Si ce protocole altère les variations d'expression moléculaire ou de la morphologie des cellules, cela traduirait une régulation homéostatique et non circadienne. Inversement, il sera également nécessaire de maintenir les souris dans un environnement de luminosité et/ou obscurité constantes, afin de déterminer si ce protocole altère les variations d'expression moléculaire ou de la morphologie des cellules, ce qui impliquerait alors une régulation circadienne et non homéostatique.

De plus, nous réaliserons une analyse exhaustive de la régulation de l'expression génique des astrocytes du VLPO en réalisant des comparaisons entre les astrocytes avant et après la période de repos et après une privation de sommeil.

L'ensemble des expériences mises en œuvre dans ce projet permettront de déterminer comment les modulations d'expression génique, des propriétés moléculaires et morphologiques des astrocytes participent à la régulation du sommeil lent. Ces expériences nous permettront à terme de mieux comprendre les mécanismes responsables du sommeil lent dans le VLPO.

La réalisation de ce projet nécessitera 785 animaux sur 5 ans.

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.

Chaque animal fera l'objet d'une surveillance accrue pendant les procédures. De plus, nos souris sont hébergées en groupe dans un milieu enrichi. Toutes les précautions sont assurées afin de respecter au mieux le bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement pour surveiller leur comportement. En cas de postures anormales, de perte de poids, d'état du poil et/ou présence de lésions de grattage, l'animal sera isolé ou euthanasié en fonction de la gravité des symptômes.

16475 Ce projet a pour objectif de permettre l'évaluation des effets de candidats médicaments sur les fonctions vitales de l'organisme (cardiovasculaire, respiratoire, système nerveux central). Ces études sont réalisées dans un cadre réglementaire conformément aux recommandations ICH S7A, ICH S7B, ICH S6, ICH S9 et ICH M3(R2) et sont indispensables avant d'envisager la première administration chez l'homme.

Le présent projet vise à évaluer les effets d'un candidat médicament chez le Macaque cynomolgus conscient:

- sur le système cardiovasculaire par télémétrie interne,
- sur la fonction respiratoire et le système nerveux central chez l'animal conscient à l'aide de la télémétrie externe et de tests fonctionnels.

Le choix de l'espèce animale pour les études de pharmacologie de sécurité est basé sur plusieurs critères notamment la réponse pharmacodynamique du modèle animal, le profil pharmacocinétique, et les données préalablement obtenues chez l'espèce considérée lors d'études préalables. Selon la guideline ICH Topic S6(R1), Step 5 Note for Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived

Products (EMA/CHMP/ICH/731268/1998 - adopted July 2011), l'espèce primate non humain peut être la seule espèce pertinente pour les essais pré-cliniques des composés biologiques (protéines thérapeutiques, anticorps monoclonaux, vaccins thérapeutiques anti-cancer...).

Les études de pharmacologie de sécurité concernées par ce projet, sont réalisées dans le cadre d'études autonomes. Les animaux sont équipés d'émetteurs télémétriques qui transmettent par onde radio les signaux cardiovasculaires vitaux tels que la pression ventriculaire gauche (pour les études autonomes), la pression artérielle, l'électrocardiogramme, ainsi que la température ou les mouvements de l'animal.

Les voies d'administration peuvent être diverses et dépendent de la voie d'administration envisagée chez l'homme.

En effet, vu les objectifs liés aux différentes fonctions vitales d'un organisme et aux aspects de pharmacodynamie, il n'existe pas de méthodes *in vitro* alternatives pour analyser les paramètres ciblés par les procédures décrites dans le présent projet. L'organisme entier doit être pris en compte dans les évaluations de Pharmacologie de Sécurité.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être évalué à 72 sur trois ans.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, si la toxicocinétique de la substance à tester est connue, un design en cross-over est généralement utilisé. Ceci consiste à traiter tous les animaux à toutes les doses dans un ordre aléatoire avec une période de récupération entre chaque administration de la substance. Ce design permet de n'avoir qu'un seul groupe d'animaux (entre 4 et 8 animaux) plutôt qu'un groupe par dose à tester. Le nombre d'animaux par groupe est ainsi déterminé à minima afin d'obtenir des résultats statistiques robustes et d'atteindre les objectifs des études.

Les animaux sont hébergés par groupe et par sexe en conformité avec la Directive 2010/63. Lors des enregistrements de télémétrie, les animaux sont maintenus soit en groupe soit pour des raisons techniques ou scientifiques, de manière individuelle.

L'état de santé des animaux est vérifié à intervalle régulier tout au long des études et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire des soins adéquats seront appliqués pour éviter l'inconfort et si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (renforcement positif, jouets, perchoirs, musique).

16476 Contexte : Le laboratoire a une grande expérience dans la réalisation des études de pharmacocinétique et dispose actuellement d'une autorisation d'expérimenter pour les pratiquer sur des souris et des rats. Nous redéposons donc ici la demande initiale, amendée pour pratiquer ces procédures expérimentales sur des hamsters syriens.

Objectifs du projet : Les études de pharmacocinétique ont pour objectif d'apporter des informations critiques sur la biodisponibilité *in vivo* de nouveaux composés chimiques potentiellement intéressants en thérapeutique. Pour cela ils seront dosés dans des échantillons de sang ou dans des organes d'animaux ayant été traités par le produit. Cette information sur le devenir du composé dans l'organisme est cruciale pour les programmes de recherche en chimie médicinale, car seuls les produits qui atteignent leur cible biologique peuvent être actifs. Il s'agira donc d'une activité transversale qui permettra de sélectionner, pour un développement futur, les molécules auxquelles les animaux sont correctement exposés.

Nombre et type d'animaux : 26 hamsters syriens permettent d'étudier la pharmacocinétique d'un composé administré selon un schéma particulier. Ce nombre est à multiplier par le nombre de pharmacocinétiques envisagées (10). On peut faire une estimation d'un besoin de 260 hamsters.

26 souris (ou 11 rats) permettent d'étudier la pharmacocinétique d'un composé administré selon un schéma particulier. Ce nombre est à multiplier par le nombre de pharmacocinétiques envisagées. On peut faire une estimation de 910 souris et de 165 rats sur la période de 5 ans.

Conformité avec la règle des 3R

- réduire : en se limitant aux expériences indispensables : ces études de pharmacocinétique ne se feront que pour un nombre restreint de composés choisis soigneusement à l'aide des informations

préalables acquises *in vitro*. Nous tiendrons compte de leur efficacité pharmacologique (modèles vitro cellulaires et moléculaires), de l'absence d'éléments suggérant une toxicité, mais aussi de leurs propriétés physicochimiques et autres mesures prédictives de leur stabilité *in vivo* (stabilité dans des solutions mimant les fluides gastriques, en présence de microsomes hépatiques...) ou prédictive de leur capacité à être absorbés par l'intestin (modèle cellulaire Caco-2...). En utilisant le nombre minimal d'animaux par expérience de pharmacocinétique : Classiquement 26 hamsters permettent d'obtenir des données solides et complètes, même en cas de perte d'une ou deux données individuelles, et d'éviter ainsi le renouvellement de l'expérience. Si compatible, des composés pourront être mélangés dans la même formulation pour obtenir 2 pharmacocinétiques avec une seule série d'animaux. Des protocoles expérimentaux seront rédigés avant toute expérimentation. Les doses, voies, fréquence d'administration et cinétique de prélèvement de sang seront soigneusement choisies en fonction des caractéristiques connues du composé.

- raffiner : par la pertinence du choix du modèle animal : nous travaillerons avec la même espèce (hamster syrien) que celle prévue pour l'évaluation de l'activité pharmacologique, et si possible avec la même souche, ainsi que le même sexe. Par la planification des études pour garantir un hébergement optimal des animaux, la disponibilité des salles d'expérimentation... La douleur infligée sera réduite au minimum : Les composés étudiés n'auront pas montré d'effet toxique dans des modèles vitro. La méthode de dosage du composé sera optimisée afin de réduire les volumes de sang à prélever, dans le but de privilégier les prélèvements les moins agressifs. En cas de signes cliniques montrant une douleur autre que minime et momentanée, le protocole sera abandonné.

- remplacer : nous exploiterons des modèles vitro et silico pour prédire les propriétés ADME des molécules chimiques et limiter ainsi l'expérimentation animale aux composés ayant un profil favorable.

16477 En France, les technologies non chirurgicales, à base de produits injectables progressent, au point que ces interventions dominent aujourd'hui ce marché. La recherche de nouveaux produits, performants et sains pour le patient, est donc plus que jamais nécessaire.

Ce projet a pour objectif de tester et d'évaluer des dispositifs médicaux injectables de complément sur le modèle porc et miniporc.

Lors de ce projet, l'imagerie médicale pourra être utilisée afin de suivre l'évolution au cours du temps des produits injectés. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requièrent uniquement une anesthésie).

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre d'animaux (maximum 30 par étude) sera variable en fonction du nombre de produits à tester et/ou du nombre de zones d'injection (environ 25 études) pour un total de 750 animaux au maximum utilisés dans le cadre de ce projet.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas encore de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de produits injectés dans un organisme vivant. Ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que la zone d'injection, les tissus environnants, l'activité de l'animal, etc.

Le type de porc utilisé sera choisi en fonction du type d'injection, d'imagerie et la durée de l'étude. Les modèles porc et miniporc ont été choisis afin de tester les différentes techniques d'injections envisageables chez l'Homme.

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. Toute anomalie sera rapportée au vétérinaire qui jugera s'il est nécessaire de réaliser un examen clinique

approfondi et interviendra dans le diagnostic, la prescription et mise en place d'un traitement thérapeutique adapté et/ou des soins divers, dans le but de soigner ou soulager l'animal.

L'administration du traitement prescrit pourra être réalisée par une personne habilitée.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles formulations de produits de comblements pour la chirurgie reconstructrice.

16478 La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de 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). Les traitements pharmacologiques disponibles actuellement sont très insuffisants puisque d'après une étude multicentrique, moins d'un tiers des patients recevant une thérapie pharmacologique parviennent à la rémission après 14 semaines de traitement. Ainsi, la dépression est un problème majeur de santé publique, nécessitant la mise au point de nouveaux traitements. Certains de ces mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple.

On pense actuellement que la dépression se manifeste chez le sujet adulte, mais que des symptômes existent dès l'adolescence. Le but de cette étude est d'observer si le modèle mis en place fournit un profil vulnérable aux troubles dépressifs à l'adolescence (saisine 1/2) et en mettant en évidence les marqueurs neuronaux par imagerie (saisine 2/2). Il sera aussi question de voir si ce profil évolue vers un état dépressif à l'âge adulte. Notre approche se basera sur un isolement social de trois semaines après le sevrage à J21 des souris ce qui correspond à l'adolescence chez cette espèce. Ce processus va induire un phénotype de vulnérabilité aux troubles dépressifs chez l'adolescent.

Pour cette expérience, plusieurs lots de souris C57BL/6 mâles et femelles (n=164) seront requis. Des couples reproducteurs seront achetés et les animaux naissants seront pris pour l'expérimentation. Ces groupes seront constitués de 15 femelles et de 5 mâles. Chaque portée sera normalisée à 6 petits et il sera sélectionné 2 mâles et 2 femelles pour constituer les lots. Les souris seront soumises à l'isolement social ou resteront groupées et cet isolement sera réalisé à l'adolescence et/ou à l'âge adulte. Elles seront donc testées pour leurs performances mnésiques, leur comportement anxieux, leur état hédonique et apathique ainsi que leur attitude de désespoir au cours de chaque étape de développement.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : l'isolement appliqué aux animaux peuvent être qualifiés de stress léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement dans l'eau de boisson. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanons plexiglass et cartons, tubes).

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. La sélection des animaux et les effets du stress chronique et ses symptômes chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. L'étude de l'activation cérébrale et de l'implication des réseaux et circuits neuronaux sous-jacents nécessite un animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible pour ce type d'étude.

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).

16479 L'estomac du cheval est composé de deux parties distinctes : la muqueuse squameuse et la muqueuse glandulaire à l'origine des sécrétions acides nécessaires pour digérer et de sécrétions protectrices. Les ulcères gastriques sont très fréquents chez les chevaux : ils concernent jusqu'à 80 à 90% des animaux dans des populations à risque, comme chez les chevaux à l'entraînement. Les ulcères qui touchent la muqueuse squameuse ont fait l'objet de la majorité des études scientifiques publiées sur l'espèce équine et un traitement efficace existe. En revanche, ce n'est pas le cas pour les ulcères qui touchent

la muqueuse glandulaire, certainement car les causes de ces ulcères sont différentes. Elle a pour sa part fait l'objet de très peu d'études chez le cheval. Pourtant, connaître l'origine de la maladie pourrait permettre de proposer des stratégies de prévention et de traitement plus adaptées.

Chez l'homme, autre espèce monogastrique touchée par des ulcères de la zone glandulaire, la bactérie *Helicobacter pylori* est associée à une inflammation de la paroi gastrique. Des bactéries de la même famille ont déjà été retrouvées dans l'estomac équin, mais le lien entre l'inflammation et une lésion de la muqueuse n'a pas été établi chez le cheval. Le premier objectif de cet essai est d'étudier la corrélation entre le microbiote adhérent à la paroi gastrique et l'inflammation locale. En parallèle, cet essai aura également pour objectif d'étudier la corrélation entre le microbiote du contenu gastrique et le microbiote adhérent à la paroi. Si la structure et la diversité des deux microbiotes sont proches, il pourrait être envisagé de moduler le microbiote pariétal par l'alimentation.

Dans cet essai préliminaire, deux régimes alimentaires différents (régime à base de concentrés et régime à base de fourrage) sont testés. Afin de réduire le nombre d'animaux impliqués dans l'essai, tout en prenant en compte la variabilité individuelle de l'écosystème gastrique, cinq chevaux sont inclus dans chaque lot, soit un total de dix chevaux pour le projet. Des échantillons de contenu gastrique sont prélevés sur les chevaux par intubation nasogastrique afin d'étudier l'écosystème bactérien. La semaine suivante, des biopsies sont réalisées au niveau de la muqueuse glandulaire. Ces biopsies permettent la recherche d'*Helicobacter pylori* par des techniques complémentaires, l'étude de l'écosystème bactérien présent sur la muqueuse et l'étude de la structure de la muqueuse. 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, une anesthésie locale est appliquée au niveau du naseau et si nécessaire une tranquillisation est également administrée.

Il n'existe pas actuellement de modèle permettant de reproduire la complexité des interactions entre la muqueuse de l'estomac et son contenu.

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.

16480 Dans l'hémorragie méningée ou sous-arachnoïdienne, le taux de mortalité atteint 30% au cours de la première semaine et 50% des patients décèdent au cours des six premiers mois, la principale complication étant une ischémie cérébrale retardée potentiellement due à une contraction anormale prolongée appelée vasospasme, des vaisseaux sanguins cérébraux à l'origine d'un pronostic neurologique défavorable pour le patient.

Nos résultats antérieurs montrent qu'un neuropeptide, l'urotensine II (UII) constitue chez les patients HSA un marqueur diagnostique du vasospasme et qu'une molécule qui bloque le récepteur capable de lier l'UII, prévient le vasospasme dans un modèle de souris hémorragique. Nos objectifs sont : i) d'étudier l'impact du système de l'activation du récepteur UT par l'UII sur la cascade d'événements post-hémorragie, et en particulier sur le vasospasme en utilisant des souris C57Bl6/j âgées de 8 à 11 semaines exprimant le récepteur UT (souris UT+/+), n'exprimant pas le récepteur UT (souris UT-/-), ou exprimant le récepteur UT humain (souris UTh+/h+). Chez ces souris, la cinétique d'apparition des événements vasculaire et inflammatoire sera évaluée à différents délais post-hémorragie (J1, J3, J5, J7) par imagerie cérébrale principalement et le rôle d'une molécule bloquant le récepteur UT sera recherché sur ces événements. Deux tests d'imagerie sur animal vivant (imagerie par résonance magnétique moléculaire (IRM) et ultrasons fonctionnels (FUS) seront utilisés permettant d'évaluer les réactivités vasculaires de façon dynamique à la suite d'une hémorragie. Le nombre d'animaux est fixé à 15 par groupe afin de tenir compte de la variabilité interindividuelle et de pouvoir réaliser des analyses statistiques. Ces études seront répétées de manière longitudinale à différents jours après la chirurgie (J1, J3, J5 et J7 post-hémorragie), ce qui est permis par l'imagerie sur animal vivant anesthésié. Des études histologiques seront réalisées à J7 à partir des cerveaux prélevés sur ces mêmes souris. Pour

l'ensemble de ces études d'imagerie et neurobiologiques, un total de 429 souris sera donc nécessaire. Tout au long du projet, la règle des 3R sera respectée. En effet, aucune méthode alternative n'existe et un suivi rigoureux des signes de douleur est réalisé tout au cours des expériences. Le nombre de souris par groupe nécessaire pour réaliser chaque expérience a été estimé en fonction de test de puissance se basant sur des données préliminaires ou des résultats déjà publiés.

Pendant les opérations, les souris seront anesthésiées. Une prise en charge de la douleur potentielle sera effectuée. Un suivi quotidien ou bi-quotidien (dans les 48h postchirurgie) sera effectué par du personnel formé et expérimenté et permettra de détecter un éventuel signe de souffrance. L'hébergement des animaux 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.

L'objectif de ce projet est de démontrer le rôle d'une nouvelle cible thérapeutique dans les pathologies vasculaires et inflammatoires consécutives à une hémorragie sous-arachnoïdienne, et le rôle bénéfique d'une molécule « candidat médicament ».

16481 L'oeuf de poule est un ovocyte entouré de réserves nutritionnelles et d'une enveloppe protectrice (la coquille). C'est dans cette enceinte close naturelle autosuffisante et stérile, que l'embryon va se développer sans contacts maternels. La poule doit donc anticiper l'ensemble des besoins nécessaires à l'embryon et déposer dans l'oeuf la totalité des ressources utiles à son développement (nutriments, systèmes de protection, molécules régulatrices...). La coquille assure la protection physique de l'oeuf et protège l'embryon au cours de son développement dans le milieu extérieur. Cette coquille est impénétrable à toutes bactéries lorsqu'elle reste intacte et assure le maintien de la stérilité de l'oeuf. Les molécules contenues dans l'ensemble des compartiments assurent aussi un rôle antimicrobien et constituent la défense chimique de l'oeuf. Notre étude vise à comprendre les mécanismes de formation des défenses de l'oeuf de poule, afin d'identifier des voies d'améliorations des défenses naturelles de l'oeuf et renforcer la sécurité alimentaire des oeufs de consommation. Les animaux utilisés seront des poules de souche commerciales. Sur chaque animal sera effectué un prélèvement du fluide utérin lors de la ponte de l'oeuf. Les animaux sont élevés pendant 1-2 ans correspondant à la période de production d'oeufs. Ils seront donc renouvelés au besoin pour une durée d'expérimentation totale de 5 années. Le nombre d'animaux maximum sera de 106 par an, soit un total maximum de 530 pour les 5 ans. 56 poules seront hébergées en cages individuelles pour le suivi et enregistrement des heures de ponte et la collecte de fluide utérin. Des prélèvements sanguins et tissulaires seront réalisés afin d'étudier l'expression des acteurs moléculaires impliqués dans la formation de l'oeuf et le dosage des marqueurs sanguins. Ce type d'expérimentation ne peut être réalisé que *in vivo*. Seuls le nombre d'animaux permettant de dépasser les seuils statistiques et fiables seront utilisés. Les personnes en charge des procédures expérimentales veilleront au respect des animaux en toutes circonstances.

Remplacer : Il n'existe pas de modèle *in vitro* ou cellulaire qui permet d'étudier mécanismes de formation des défenses de l'oeuf.

Réduire : Pour chaque lot, le nombre d'animaux a été réduit à son minimum mais reste suffisant pour garantir une précision de la variance qui permettra de détecter les transcrits différentiels

Raffiner : L'injection de prostaglandines permet de recueillir la coquille en formation à différents stades physiologiques. Cette méthode reproduit les contractions de l'utérus comme elles se produisent naturellement lors de la ponte de l'oeuf. Cette procédure évite la mise à mort des animaux et les conséquences sur le comportement et les capacités de ponte de l'animal par la suite. Les animaux en suivi individuel sont hébergés dans de cages contiguës et grillagées enrichies avec perchoir, blocs à piquer et objet suspendu à picorer. Les animaux peuvent se voir entre eux pour permettre des interactions sociales.

16482 Il s'agit de protocoles d'immunisation sur des caprins adultes. Les animaux reçoivent plusieurs injections de gamma globulines IgM humaines entraînant le développement d'anticorps anti-gammaglobulines humaines qui permettent la fabrication de test de diagnostic *in vitro*.

Les anticorps obtenus sont utilisés pour le dépistage, par sérologie, d'anticorps témoins des maladies : Toxoplasmose, Rubéole, Hépatite A et Hépatite B.

Il n'existe pas de méthode in-vitro connue à ce jour pour obtenir des anticorps polyclonaux anti-gammaglobulines humaines ayant la spécificité et l'affinité requises.

Ces animaux doivent au préalable avoir été rendus tolérants aux IgM humaines dès leur plus jeune âge.

L'espèce caprine a été choisie car c'est un modèle répondant bien à ce type d'antigènes. La chèvre est un animal docile permettant, par la technique de la plasmaphérèse, d'obtenir un volume important de sérum hyper-immun avec un faible nombre d'animaux.

Le choix des animaux, les immunogènes et les protocoles ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injection et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible.

La troupe est constituée de 20 animaux disponibles pour cette production.

Les animaux sont hébergés et soignés quotidiennement dans des conditions conformes à la réglementation. L'antigène inoculé à l'animal appartient à l'espèce humaine et déclenche une réponse immunitaire sans pour autant dégrader l'état sanitaire. Toutefois toute dégradation éventuelle de l'état sanitaire des animaux fait l'objet d'un traitement médical mis en place par notre vétérinaire référent.

16483 *Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène particulièrement fréquente dans les infections acquises en ville (« communautaires ») et les infections acquises à l'hôpital (« nosocomiales »). Ce pathogène, en plus d'être doté d'un grand nombre de facteurs de virulence et de toxines est associé à une résistance élevée aux antibiotiques.

Dans ce contexte, des alternatives innovantes (anticorps) sont actuellement en développement et visent à neutraliser la ou les toxines pathogènes produites par *S. aureus* afin d'en diminuer la virulence. Considérant que la souris n'est pas sensible à l'action de certaines toxines, le choix s'est porté sur une autre espèce animale, le lapin, qui constitue un modèle de choix pour l'évaluation de l'efficacité de thérapeutiques dans les infections à *S. aureus*.

Le but de cette étude est donc d'évaluer l'efficacité de différentes doses d'anticorps SYN100 dans un modèle de pneumonie à *Staphylococcus aureus* chez le lapin. La durée de l'étude sera de 6 mois et concernera au maximum 48 animaux.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière a été apportée au respect de la règle des 3R.

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 3 par groupe (répété 2 fois) grâce à l'expérience acquise lors d'études similaires.

Raffinement : Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi. L'infection bactérienne sera réalisée sous anesthésie générale et le traitement sera administré par voie intra-veineuse à l'oreille en une seule fois (tout comme chez l'homme, ce type d'injection ne nécessite pas d'anesthésie ou d'analgésie particulière). Des critères d'arrêts de l'étude, supportés par une grille de score clinique, ont été définis afin d'assurer le bien-être des animaux.

Remplacement : Dans le contexte de l'étude, le remplacement du modèle in-vivo pour la constitution d'une pneumonie expérimentale par un autre système n'était pas envisageable notamment pour des aspects de diffusion tissulaire et systémique.

16484 Les formations agréées par le Ministère chargé de l'Agriculture, permettent d'obtenir une autorisation d'expérimenter sur les animaux de niveaux Concepteur (ex niveau 1) ou Appicateur (ex niveau 2), requise à toute personne chargée de la conception et de la mise en application des projets d'éthique (Directive européenne 2010/63/EU). 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 cette fonction doivent avoir acquis la compétence suite à une formation spécifique. Ce projet est donc un projet éducatif et requis par la loi. Il consiste à former les concepteurs de projet à la pratique de procédures expérimentales de base et faiblement

invasives sur des souris et des lapins. Le but est d'initier le personnel en formation aux techniques suivantes : préhension, contention, manipulation adaptée aux différentes procédures de routine telle que l'administration, les prélèvements de routine, l'anesthésie et la mise à mort.

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 à chaque participant de pouvoir manipuler les animaux.

Concernant la partie propre à l'utilisation de souris, afin de 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 seront réalisées après anesthésie des animaux. Il y aura 1 session de formation (niveaux concepteur et applicateur), par an. Pour chaque session de formation, 1 souris par binôme sera nécessaire soit au maximum 28 souris par an. Ces souris seront des animaux non utilisés de projets d'élevage autorisés dans l'établissement utilisateur. Le projet utilisera donc un maximum de 140 souris sur 5 ans.

Concernant la partie propre à l'utilisation des lapins, la douleur et l'angoisse des animaux seront pris en considération (groupe de petites tailles pour éviter le stress). Pour chaque session de formation, 7 lapins seront nécessaires, soit 35 lapins sur 5 ans. Ces lapins seront remis dans leurs cages respectives après les sessions. La réalisation de formations de qualité sera un élément déterminant de l'application de bonnes pratiques des chercheurs et contribue donc de manière majeure à la règle des 3R à terme.

De façon à garantir la qualité de la formation, les formateurs seront des personnels recrutés pour leur compétence dans la réalisation technique de chacune des procédures et leurs aptitudes pédagogiques.

16485 Chaque étude de ce projet vise à évaluer l'activité thrombogène d'un candidat médicament chez le lapin avant son utilisation chez l'homme.

Principalement lorsque des candidats médicaments sont préparés à partir de sang humain (exemple: protéines sanguines), il existe un fort risque pour ces candidats médicaments de provoquer chez le patient, de manière indésirable, la formation de caillots de sang (=effet pro-thrombogène). Ces caillots (thrombus) pourraient alors induire des phlébites, embolies pulmonaires, accidents vasculaires cérébraux ou crises cardiaques.

Il est donc très important de vérifier l'absence d'activité pro-thrombogène de ce type de molécule.

Le modèle de Wessler chez l'animal anesthésié consiste en l'induction d'une stagnation de sang au niveau d'une infime portion de veine choisie pendant quelques minutes.

La propriété pro-thrombogène du candidat médicament est alors évaluée par mesure de la taille du thrombus formé dans cette portion.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 600 lapins 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 lapin car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer l'effet pro-thrombogène d'un nouveau 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 lapin est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal 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 sans réveil avec un suivi du degré d'anesthésie
- . la détermination des points limites
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

16486 But du projet: 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. 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 aigüe 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 mis en jeu dans la progression de la lésion ischémique, et dans la récupération fonctionnelle qui suit l'AVC, plus concrètement, l'évolution de l'autophagie.

Le projet fera l'objet de trois phases distinctes. La première sera une étude de l'impact de l'autophagie sur la l'ischémie cérébrale 1 jour et 5 jours après la chirurgie, dans model d'ischémie permanente (le modèle de FeCl₃ sur ACM) et le modèle transitoire (le modèle thromboembolique dont le principe repose sur l'injection d'un agent coagulant (la thrombine) directement dans la lumière artérielle).

La deuxième phase sera une étude de l'impact de la Trehalose (un disaccharide activateur de l'autophagie qui a montré des résultats positifs dans les maladies neurodégénératives ; des essais cliniques concernant son utilisation dans diverses pathologies sont en cours) sur l'ischémie cérébrale dans les modèles susmentionnés, en étudiant plus en détail le rôle de la neuroinflammation dans ces processus.

La troisième phase sera de démontrer si la Trehalose permettrait d'élargir la fenêtre thérapeutique du tPA, et pourrait éviter les effets secondaires indésirables.

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.

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 et l'ischémie 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 selon nos travaux précédents publiés et la littérature. 501 souris seront nécessaires pour réaliser les 3 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. 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.

16487 Des bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent se développer, entre autres, au niveau du tube digestif lors de traitements antibiotiques chez l'Homme. L'apparition de ces résistances représente un problème majeur de santé publique. Il est alors nécessaire de développer une alternative aux

traitements antibiotiques existants afin de traiter une pathologie d'origine bactérienne chez l'Homme tout en limitant l'apparition de résistances au niveau du tube digestif.

Le programme dans lequel est inclus ce projet propose de tester des antibiotiques peu voire plus utilisés aujourd'hui chez l'Homme et de quantifier l'apparition de résistances lors de l'administration de ces antibiotiques chez le porc comme espèce modèle pour l'Homme.

Dans une première partie du programme réalisée chez le porc, une association d'antibiotiques (minocycline+polymyxine) a été testée mais les résultats sont peu concluants en raison de la présence de nombreux effets secondaires dus à l'administration de polymyxine (apparition d'un rash de courte durée, apparition d'oedèmes au point d'injection lors d'administrations répétées) et d'un faible nombre d'animaux utilisés (nous n'avons pas rajouté plus d'animaux du fait de l'apparition des effets secondaires).

Cette partie du programme a alors pour but de quantifier l'apparition de résistances lors de l'administration de minocycline seule, cet antibiotique pouvant tout de même être intéressant chez l'Homme car son activité antibactérienne serait maintenue sur des souches bactériennes résistantes aux autres tétracyclines.

Le projet a alors pour objectif de déterminer si, pour des doses de minocycline permettant de reproduire chez le porc les concentrations plasmatiques en minocycline retrouvées chez l'Homme, on observe une apparition de bactéries résistantes aux tétracyclines au niveau du tube digestif.

Vingt-quatre porcelets seront utilisés pour ce projet. Ils seront répartis en trois groupes de 8 porcs: un groupe ne recevant pas de traitement antibiotique (CT), un groupe recevant de la minocycline à faible dose (LD) et un groupe recevant de la minocycline à forte dose (HD). Un cathéter veineux central sera posé sous anesthésie générale aux porcs des groupes LD et HD et ces porcs recevront une administration intraveineuse de minocycline par jour pendant 5 jours. Des prélèvements de sang seront réalisés pour déterminer les concentrations en antibiotiques retrouvées dans le sang. Des prélèvements de fèces seront réalisés sur les 4 jours précédant le traitement, pendant le traitement et sur les 17 jours suivant le traitement antibiotique.

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 (absorption, destruction par la flore intestinale, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale...). Il en est de même pour l'émergence de résistances au niveau du tube digestif. Cependant, si nous démontrons que le traitement peut être utilisé chez l'Homme car il n'entraîne pas la sélection de résistances bactériennes au niveau du tube digestif, il faudra ensuite démontrer son efficacité sur les bactéries pathogènes responsables de problème pulmonaires chez l'Homme. Cette deuxième partie du projet, soit l'évaluation de l'efficacité du traitement pourra être réalisée *in vivo* pour éviter l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux ou d'animaux malades (utilisation d'un système *in vitro* permettant de soumettre des bactéries pathogènes à des concentrations fluctuantes en antibiotiques).

Le nombre de porc par groupe nécessaire pour mener à bien ce projet a été déterminé à partir des résultats obtenus lors des tests effectués avec l'association minocycline/polymyxine. Cependant, les expérimentations seront réalisées d'abord sur la moitié des porcs pour des raisons de capacité d'hébergement (4 CT, 4 HD et 4 LD, deux phases) et en fonction des résultats obtenus sur la première phase, la seconde pourrait éventuellement être évitée.

Les porcs seront placés en boîtes individuels afin d'éviter un transfert de bactéries résistantes d'un porc à l'autre et d'éviter un risque d'arrachage des cathéters entre les porcs. Les boîtes permettront cependant aux porcs de se sentir, s'entendre et se voir, et seront équipées de balles à mâcher suspendues à des chaînes en inox.

Pour limiter le stress des animaux, ils seront habitués à être manipulés avant la réalisation du projet et du sirop de cassis leur sera donné comme "récompense" pour faciliter leur acceptation/apprentissage des manipulations. Les porcs des groupes LD et HD ayant reçu un antibiotique ne possédant pas d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) vétérinaire, ils seront euthanasiés à la fin du projet. Les porcs du groupe CT seront euthanasiés pour prélever des contenus intestinaux "blancs" (sans antibiotique) pour effectuer des dosages pour un autre projet.

16488 De nombreuses méthodes analytiques nécessitent des étapes de standardisation, calibration, ou font l'objets d'améliorations/innovations.

Pour ce faire, des échantillons des sang, tissus ou autre doit être prélevé sur des individus sains, afin de constituer un pool de référence ou témoin.

Des échantillons peuvent également s'avérer nécessaire afin de fournir du matériel d'observation lors de travaux pratiques à destination des étudiants vétérinaires ou universitaires (TP d'immunologie, TP d'histologie, etc...)

Dans ce projet, il s'agit principalement de permettre la collecte de fluide (sang, urine etc.) ou le prélèvement de tissus (biopsie de peau, ponction de moelle osseuse etc.).

Toutes les espèces pouvant être hébergées dans nos locaux (de la souris à des animaux de moyen format) pourront être inclus dans ce projet. Toutes les demandes seront analysées au préalable par la structure du bien-être animal.

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 permettant le nombre de prélèvements nécessaire pour assurer la validation des méthodes analytiques).

Les animaux pourront faire l'objet d'une réutilisation, dès lors que les prélèvements effectués n'impactent ni leur santé, ni leur bien être (les prélèvements envisagés sont dans leur majorité peu invasifs).

Cette réutilisation permet la réduction du nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, la réalisation de ces prélèvements peut permettre la réduction du nombre d'animaux utilisés dans d'autres projets, ou permettre le développement de méthodes de substitution à l'expérimentation animale.

Le nombre d'animaux nécessaires dans le cadre de ce projet est estimé, au maximum à 2400, soit 1800 rongeurs, 250 lapins, 50 furets, 100 chiens, 100 poules et 100 petits ruminants. Ces chiffres sont des estimations, à condition que la demande se confirme, mais ils peuvent être bien inférieurs.

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 la procédure. Quelles que soient les procédures, la douleur est, si nécessaire, rigoureusement contrôlée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (anesthésie/analgésie).

Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes des procédures 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 pour les rongeurs, jouets pour les porcins/chiens) sont présents dans les hébergements.

16489 La Directive Cadre Européenne sur l'eau fixe des objectifs de bon état écologique des cours d'eau qui sont ensuite déclinés en "orientations fondamentales" et en mesures dans le Schémas Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux. Dans ce cadre de nombreux ouvrages "bloquants" du point de vue de la continuité écologique ont été aménagés. L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'efficacité des travaux restauration de la continuité piscicole sur des cours d'eau à forts enjeux piscicole.

Lors de cette étude "in natura" des poissons seront capturés par pêche électrique et équipés de petites "puces" internes (<32mm) PIT-tag (Passive Integrated Transponder) : l'implantation dans la cavité générale est réalisée sous anesthésie générale et dure moins d'une minute. Chaque individu est ainsi individualisé par un code unique qui permet de le relier à ses caractéristiques (espèce, taille, lieu de marquage, ...).

Plusieurs antennes de détection sont ensuite installées sur les ouvrages de franchissement nouvellement aménagés. Lorsqu'un poisson franchi une antenne celle-ci active son PIT-tag et récupère l'identifiant du poisson. La disposition des antennes permettra de connaître le sens de circulation de chaque poisson, s'il a réussi à franchir totalement l'ouvrage et éventuellement son lieu de passage sur l'ouvrage. Toutes ces données peuvent être mises en relation avec les caractéristiques du poisson

(espèces, taille, éventuellement sexe, ...) et les conditions environnementales (débits, température de l'eau, période de l'année, ...) ; celles-ci sont étudiées pendant une année minimum.

Cinq espèces patrimoniales seront ciblées dans ces suivis : la truite fario, l'ombre commun, le barbeau fluviatile, le chevesne et le chabot. Nous marquerons 1000 poissons maximum pour chacune d'entre elle, soit 5000 par site. Le nombre de sites étudiés dans les cinq prochaines années sera au maximum de six, soit un maximum de 30000 poissons marqués (6000 par espèce). D'après nos connaissances des peuplements piscicoles des cours d'eau étudiés l'objectif ne sera vraisemblablement pas atteint pour l'Ombre commun et le Chevesne. Nos résultats antérieurs sur le Chabot ayants montrés de faibles distances de déplacement, les marquages seront concentrés dans le premier kilomètre en aval du site suivi pour cette espèce.

L'objectif étant de valider l'efficacité des travaux réalisés en milieu naturel, nous ne pouvons nous affranchir du modèle animal, et seul des poissons sauvages peuvent être utilisés (pas de biais de comportement ou de condition physique). L'utilisation de techniques type vidéocomptage a également été étudiée mais ne peut être envisagée sur des dispositifs de franchissement en enrochements libres ou passe à macrorugosité par exemple. De plus ces techniques ne permettent pas de mesurer le temps de franchissement et le taux de franchissement. Pour finir l'utilisation de PIT-tag permet de connaître les caractéristiques précises de chaque individu qui franchit (e.g. espèce, taille, poids, éventuellement sexe) ainsi que le comportement migratoire de chaque poisson (e.g. distance depuis le point de marquage, nombre de franchissement, période de franchissement).

Ce projet a été développé en prenant soin de respecter la règle des 3R mais le marquage "in natura" de poissons sauvages ne peut être évité pour atteindre nos objectifs ("remplacer"). Le nombre d'individus a été calculé de façon à avoir des résultats suffisants pour évaluer la franchissabilité des ouvrages pour chaque espèce, en tenant compte des taux de détection observés dans d'autres études ("réduire"). Afin de limiter la souffrance des poissons lors des manipulations ceux-là seront anesthésiés pendant l'opération et stockés dans leur milieu d'origine le plus longtemps possible ("raffiner"). Tous les individus marqués feront l'objet d'un examen visuel avant opération pour vérifier leur état sanitaire et seront gardés en observation jusqu'au rétablissement total après opération ("raffiner").

16490 Le traitement ou la prévention des hémorragies chez les patients hémophiles A repose sur l'injection intraveineuse de facteur VIII (FVIII) thérapeutique. La complication majeure de ce traitement est l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII qui neutralise le FVIII thérapeutique. Actuellement, la seule approche permettant une éradication des anticorps 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'anticorps anti-FVIII représente donc une impasse clinique et un problème sociétal majeur.

Plusieurs stratégies destinées à induire une tolérance au FVIII thérapeutique ont été développées chez la souris déficiente en FVIII. Récemment, nous avons démontré que le transfert materno-fœtal (de la mère aux fœtus) des domaines immunodominants du FVIII couplés au domaine Fc de l'immunoglobuline G, protège partiellement les souriceaux du développement d'une réponse immunitaire dirigée contre le FVIII thérapeutique à l'âge adulte. Notre hypothèse est que la protection était partielle car seuls les domaines A2 et C2, qui représentent 30% de la taille du FVIII, étaient utilisés.

Ici, notre objectif est de transférer la molécule entière de FVIII présente dans la circulation maternelle vers la circulation fœtale, et ainsi de conférer une protection immunologique complète. Pour cela, des molécules capables de fixer le FVIII et de traverser le placenta (que nous nommons 'Exfiltrines') seront injectées dans le sang maternel.

Aux vues de la potentielle translation de notre stratégie en clinique, une souris transgénique déficiente pour le FVIII murin et exprimant de façon hétérozygote le FVIII humain nous permettrait de nous rapprocher de manière optimale des conditions cliniques. En effet, chez l'Homme, la majorité des femmes porteuses d'hémophilie A expriment le gène codant le FVIII sur un seul de leurs deux allèles.

Pour ce projet d'une durée de 5 ans, nous prévoyons d'utiliser 1608 souris. Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R :

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 (notamment le passage transplacentaire). Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes *in vitro* pour analyses ultérieures.

Réduction : Le nombre de répétition des expériences sera défini de manière rationnelle : si une expérience donne des résultats statistiquement significatifs avec une puissance appropriée, elle ne sera pas répétée, sinon elle sera répétée une à deux fois maximum. Les organes, sérum et cellules des souris sacrifiées en fin d'expérience sont conservés; ainsi, aucune expérience supplémentaire ne doit-elle être faite si des questions nouvelles surviennent.

Raffinement : les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique françaises. 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 animaux malades seront soignés ou euthanasiés. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

16491 Les lésions cérébrales peuvent entraîner des pertes de fonction importantes pouvant être extrêmement handicapantes. De nombreux travaux de recherche portent sur les changements rapides de la connectivité entre neurones à l'échelle synaptique microscopique à la suite de lésions. Cependant, si la zone lésée du cortex (par exemple lors d'un accident vasculaire cérébral) est trop importante, les reorganisations à l'échelle locale des réseaux neuronaux ne sont pas suffisantes pour restaurer des fonctions perdues. Il serait intéressant de pouvoir explorer la possibilité de promouvoir le "recablage" des axones sur de grandes distances. Cependant, les réorganisations d'axones entiers à ces grandes échelles sont peu étudiées. Nous pensons que les modifications des projections à longue distance de certains neurones pourraient avoir un effet majeur sur la récupération du cerveau après une lésion. Ce phénomène pourrait être contrôlé par des facteurs de survie intrinsèques aux axones. Ce projet propose l'utilisation de techniques de séquençage et de traçage pour étudier les protéines de survie des axones produites dans le cortex de la souris à la suite de lésions périphériques. Ce projet devrait nous permettre de formuler des hypothèses sur les voies moléculaires impliquées dans le remodelage des connections axonales à grande échelle.

Comme cette étude a pour vocation de découvrir de voies moléculaires potentiellement spécifiques des neurones de mammifères, nous utiliserons des souris comme animal modèle. Effectivement, les connaissances actuelles sur le cerveau et sur la biologie des mécanismes moléculaires contrôlant la stabilité et la croissance des axones ne permettent pas de modéliser ces phénomènes *in-silico*. De plus, les systèmes de culture *in-vitro* ne peuvent pas reconstituer pour l'instant l'environnement cellulaire et extracellulaire complexe du cerveau, qui joue sûrement un rôle important dans le contrôle de la survie des axones. Le placement de l'étude chez les mammifères permettra des retombées plus immédiates pour les sciences bio-médicales. Afin de n'utiliser que le nombre d'animaux nécessaires, nous nous basons sur des études similaires récentes qui utilisent entre 6 et 8 souris par groupe pour obtenir assez de matériel biologique pour permettre de séquencer les gènes exprimés. Il est possible que, du fait des progrès en technologies de séquençage, nous pourrions diminuer le nombre de souris nécessaire par le raffinement de la procédure. Nous devons réaliser l'expérience 4 fois (3 pour moyenniser les résultats, 1 expérience contrôle), et pour chaque expérience, nous utiliserons 2 groupes de 8 souris chacun. Nous utiliserons donc un total de 56 souris. Le raffinement dans le design de cette expérience permet de réduire le nombre de fois que les animaux sont manipulés par rapport à des études similaires. En effet, les protocoles habituels de déprivation sensorielle obligent à manipuler les animaux quotidiennement sous anesthésie afin de maintenir la déprivation en rasant les poils, ce qui n'est pas confortable pour l'animal, et peut interférer avec les résultats expérimentaux du fait de l'utilisation répétée d'anesthésiques et la manipulation fréquente. Nous utilisons une stratégie alternative qui consiste à réaliser une biopsie de la région de la peau contenant les moustaches principales de l'animal (correspondant à peu près à une surface de peau de 2mm carrés). Ainsi, une fois cette biopsie réalisée, les moustaches de la région dermique retirée ne repoussent plus, et changent donc sur le long terme l'expérience sensorielle de l'animal. Ceci devrait permettre de diminuer

le stress des animaux du fait de l'absence de manipulations répétées, et d'augmenter la qualité des résultats d'analyse moléculaire des réorganisations neuronales dans le cortex.

Pour valider la présence de remaniements d'axones ou de dendrites dans le cortex, nous accompagnerons cette expérience de déprivation sensorielle des moustaches par des marquages de projections de neurones corticaux par traçages afin de mesurer les remaniements plastiques ayant lieu dans le cortex. Nous effectuerons ces traçages à la suite de pertes sensorielles chez l'adulte, mais aussi chez le nouveau né afin de déterminer la spécificité des mécanismes étudiés au cerveau adulte. Les expériences de traçages utiliseront 60 animaux: 3 expériences de 10 animaux chacune, à 2 âges différents de perte sensorielle (naissance et adulte). Chaque expérience correspondra à une classe particulière de neurones corticaux pouvant contrôler l'homéostasie du réseau.

Le nombre total d'animaux utilisés dans cette étude (recherche de gènes cibles: 56, et validation de leur effet sur les projections axonales: 60) est donc de 116.

16492 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer l'innocuité d'un candidat médicament chez le rat en utilisant le test d'Irwin. Le projet consiste à évaluer les effets des candidats médicaments sur le comportement général, les réflexes neurologiques, le poids et la température corporelle chez le rat.

Le test d'Irwin consiste en une batterie d'observations comportementales permettant d'évaluer l'aspect et le comportement général de l'animal, différents réflexes neurologiques ainsi que la température corporelle et le poids après administration du produit à tester. Ces observations sont répétées dans le temps sur une période totale de 72 heures, période suffisante pour caractériser l'effet du produit.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 2400 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R: remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur le système nerveux. 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 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 :

- . 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.
- . 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 adaptés 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

16493 L'adénocarcinome ductal pancréatique (PDAC) représente 90 % des cancers du pancréas diagnostiqués. Il se classe à la 4^{ème} place des causes de mortalité par cancer dans les pays industrialisés et la survie à 5 ans est encore aujourd'hui inférieure à 10%. Le PDAC présente comme signature histopathologique une infiltration fibreuse (stroma-tumorale) abondante. Ce cancer souffre aujourd'hui de méthodes diagnostiques et d'options thérapeutiques très limitées. Ce projet a pour objectif d'évaluer différents vecteurs (anticorps, fragment d'anticorps, nanobodies) radiomarqués pour le ciblage spécifique de récepteurs néoplastiques (récepteur du facteur de croissance épidermique : EGFR) et stromales (protéine d'activation des fibroblastes : FAP) du PDAC. Ces cibles ont préalablement été évaluées par analyse immunohistochimique sur des échantillons de PDAC humains et leurs potentiels cliniques pour l'imagerie et la thérapie sont validés. Une approche théranostique

sera appliquée avec l'utilisation de radionucléide spécifique pour le diagnostique (émetteur β^+) et la radiothérapie interne vectorisée (RIV) (émetteur β^- , α). Ce type d'approche a déjà été appliqué par l'équipe dans le cadre du cancer ovarien et fait l'objet de nombreux essais cliniques.

Nous souhaitons tester sur des modèles murins orthotopiques du PDAC la biodistribution et l'efficacité thérapeutique de nos théranostiques. Seule une étude *in vivo* permettra d'avoir des informations sur les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques en temps réel et l'efficacité thérapeutique des radiopharmaceutiques. Le modèle murin est tout à fait approprié car les expérimentations *in vitro* ne permettent pas de simuler la complexité d'un organisme. Nous limiterons au maximum le nombre de souris nécessaires pour mener à bien ce projet (principe des 3R). La biodistribution des vecteurs biologiques sera notamment suivie par une technique d'imagerie non invasive la tomographie par émission de positrons (TEP) couplé à la tomodensitométrie (CT). Cette imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les protocoles expérimentaux puisqu'il n'y a pas de sacrifices à chaque temps d'imagerie. En outre, l'imagerie permet de raffiner le projet puisqu'elle fournit des informations complémentaires aux techniques classiques ex-vivo.

Trois lots d'animaux seront nécessaires pour les différentes étapes de ce projet : (i) l'établissement de modèles de PDAC à forte densité stromale, (ii) l'évaluation par imagerie TEP/CT de la biodistribution de nos agents théranostiques, et (iii) l'évaluation du potentiel thérapeutique des radiopharmaceutiques développés.

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.

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 888 souris sur une durée de 5 ans.

16494 L'alpha-synucléine est une protéine qui est présente sous une forme agrégée dans les lésions cérébrales des patients atteints de la maladie de Parkinson/démence à corps de Lewy/atrophie multisystématisée (« synucléinopathies »). Dans ce projet, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées qui expriment l'alpha-synucléine humaine sous une forme responsable de cas familiaux de maladie de Parkinson chez l'homme. Ces souris (M83) développent au cours du vieillissement des troubles locomoteurs, menant à une mort précoce de l'animal. Cette maladie apparaît beaucoup plus tôt si l'on injecte dans le cerveau de celles-ci un extrait cérébral contenant de l'alpha-synucléine agrégée (cerveau de souris ou de patients humains atteints de synucléinopathie) ou même de l'alpha-synucléine produite par génie génétique présentée sous une forme fibrillaire. La maladie s'accompagne de l'agrégation de la protéine alpha-synucléine de ces souris, dans les régions postérieures du cerveau et la moelle épinière. Nous avons récemment mis en évidence qu'un traitement *in vitro* d'un homogénat de cerveau de souris amplifie considérablement la formation d'agrégats d'alpha-synucléine et l'objectif de notre projet est maintenant d'évaluer dans quelle mesure ces agrégats ainsi produits peuvent eux-mêmes accélérer la maladie par inoculation dans le cerveau de souris. Les souris sont hébergées dans des cages enrichies. Ces expériences nécessitent au total 240 souris M83 adultes, nombre réduit au maximum tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables pour la mesure du délai d'apparition des signes cliniques caractéristiques et les analyses neuropathologiques de la distribution des lésions, chez 12 animaux par lot expérimental. L'étude ne peut ainsi être remplacée par l'utilisation de méthodes alternatives. Ces souris feront ainsi l'objet d'un suivi clinique individuel afin de détecter l'apparition des symptômes propres à la lignée, dont le délai de survenue est ainsi évalué. A l'apparition des premiers signes, l'animal déclaré malade est euthanasié, afin d'éviter toute souffrance liée à la progression de la maladie. Les résultats de l'étude sont ainsi fondés sur l'analyse de la durée de survie de ces animaux accompagnée d'analyses biochimiques et immunohistochimiques du cerveau permettant d'évaluer la distribution et les caractéristiques de l'alpha-synucléine dans le cerveau des souris malades.

16495 La prise de poids résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques et conduit le plus souvent au développement de l'obésité et ses complications comme le diabète de type 2. L'effet « yoyo », soit l'alternance de prises et de pertes de poids, augmente encore plus le risque de développer des maladies métaboliques. Le diabète de type 2 se définit par une sécrétion d'insuline insuffisante par les cellules beta des îlots pancréatiques en réponse au glucose sanguin. Cette maladie

se caractérise par une inflammation au sein même des îlots avec notamment l'accumulation de cellules immunitaires innées majoritairement des macrophages pro-inflammatoires qui participent à la défaillance des cellules beta. En revanche, des macrophages bénéfiques sont également observés dans les îlots à l'état physiologique (soit dans un contexte non diabétique). Ces macrophages dits « résidents » contribuent à la maintenance d'une bonne sécrétion d'insuline des cellules beta. De manière intéressante, ces macrophages semblent être très proches des vaisseaux sanguins des îlots, en contact direct avec les cellules endothéliales.

L'objectif de ce projet de recherche est donc d'explorer si les macrophages résidents des îlots jouent un rôle majeur dans l'adaptation des cellules beta à un surplus énergétique à la suite d'un régime hypercalorique (riche en graisses ou en saccharose). Dans ce but, l'effet d'un régime hyper-calorique à court terme (avec ou sans répétition) sera testé chez des souris sauvages. De plus, des souris transgéniques dont les macrophages possèdent une protéine verte fluorescente, seront étudiées afin d'analyser et de visualiser les macrophages des îlots pancréatiques. Un marqueur fluorescent des cellules endothéliales pourra également être utilisé pour visualiser in situ la relation des macrophages avec les cellules des vaisseaux sanguins. Certaines de ces souris subiront un traitement afin de 1/ réduire le nombre de macrophages résidant dans les îlots pancréatiques, 2/ de bloquer le contact entre des macrophages avec les cellules endothéliales ou 3/ d'évaluer le niveau de multiplication des cellules beta.

La recherche animale est indispensable pour cette étude. Les modèles murins choisis permettront de mettre en évidence si les macrophages résidents des îlots pancréatiques contribuent à promouvoir la production d'insuline lors d'une prise de poids. Cela pourrait déboucher sur la découverte de nouvelles voies thérapeutiques pour le traitement du diabète, la maladie d'une sécrétion d'insuline insuffisante.

Afin de permettre une caractérisation complète et statistiquement robuste de nos modèles, le nombre total d'animaux utilisés sera de 1535 souris sur une durée de 5 ans. La stratégie des 3R sera respectée :

- Remplacement : Le modèle de référence dans l'étude de l'obésité reste la souris et le modèle transgénique permettant d'identifier et visualiser les macrophages sont des souris. Lorsque cela est possible, toutes les expériences préliminaires seront réalisées *in vitro*.

- Réduction : Pour chaque protocole, des groupes de 10 à 30 souris (5 souris par condition pour chaque expérience) seront créés afin d'obtenir des groupes suffisamment puissants à la fin de l'étude pour obtenir des résultats robustes et significatifs. Ces groupes prennent en compte la mortalité naturelle et intrinsèque à l'étude (environ 10%), les risques d'agressivité entre souris mâles et les difficultés techniques liées à l'étude des îlots pancréatiques (environ 20% d'échec dans la technique d'isolement des îlots). Ces souris seront également utilisées pour d'autres projets dans l'équipe de recherche concernant d'autres organes, afin de réduire le nombre total de souris sous expérimentation.

- Raffinement : Les animaux seront acclimatés à l'animalerie au moins une semaine avant le début de chaque expérience, selon les règles éthiques imposées par la réglementation et le protocole établi au centre d'expérimentation fonctionnelle. Les animaux seront habitués à être manipulés avec un suivi de poids au moins hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux. Les animaux bénéficieront d'une cage enrichie avec des carrés de lanières de papier compactées et des maisons en carton permettant la formation d'un « nid » par les souris, la stimulation de leur activité naturelle et la diminution du stress. L'utilisation d'un régime riche en graisses et les traitements envisagés ne représente pas de stress particulier pour les animaux.

16496 Le cancer colorectal (CCR) est la deuxième cause de mortalité par cancer en Europe. La variation géographique de l'incidence montre comment les facteurs environnementaux, principalement les habitudes alimentaires, jouent un rôle majeur dans cette maladie. En particulier, des preuves convaincantes suggèrent que la consommation de viande rouge et de viande transformée augmente le risque de CCR. En ce qui concerne les autres groupes d'aliments, comme le poisson, les légumes et les fruits non féculents, les preuves de ce lien sont considérées comme limitées bien que des études épidémiologiques suggèrent une réduction du risque de CCR associée à leur consommation.

Le rôle du microbiote intestinal dans la santé est maintenant pleinement reconnu et il a été montré qu'un déséquilibre de ce microbiote jouait un rôle dans le développement de nombreuses maladies telles que l'obésité, le diabète, les maladies inflammatoires de l'intestin ou des pathologies psychiatriques. Dans ce cadre, notre projet a pour objectif de déterminer la contribution du microbiote intestinal dans les effets de différents régimes alimentaires sur le CCR. Nos résultats pourraient ainsi permettre l'identification de bactéries intestinales qui pourraient soit jouer un rôle protecteur, soit favoriser le développement du CCR.

Pour cela, des rats qui développent naturellement des CCR recevront 4 types de régimes : régime carné, régime carné enrichi en tocophérol (vitamine E), régime pesco-végétarien (poissons et végétaux), régime contrôle. Cette partie de l'étude sera réalisée chez nos partenaires Italiens. Les fèces des rats ayant reçu les différents régimes seront alors utilisées pour transférer leur microbiote à des rats Fischer axéniques (dépourvus de microbiote) dans notre laboratoire. Une injection unique d'azoxyméthane (cancérogène) sera effectuée chez les rats receveurs des différents microbiotes pour initier une cancérogenèse. Tous ces rats recevront ensuite le régime contrôle pendant 14 semaines. Le poids corporel ainsi que les apports de nourriture et d'eau seront surveillés chaque semaine. À la fin de la 14e semaine, les rats seront euthanasiés. Les lésions précancéreuses et les tumeurs macroscopiques dans le côlon seront alors déterminées. En plus du côlon, le sang et les fèces seront prélevés pour effectuer des analyses biochimiques et de composition du microbiote.

Du fait de la complexité des relations entre régime alimentaire, microbiote intestinal et cancer, des études sur des modèles animaux sont nécessaires pour étudier en détail les mécanismes impliqués. De plus, des animaux axéniques sont nécessaires afin de permettre des transplantations de microbiote et ainsi déterminer la contribution du microbiote intestinal dans la survenue du CCR, objectif principal du projet.

Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le projet prévoit ainsi le recours à un minimum nécessaire de 40 rats sur 5 ans. Chaque groupe sera composé de 10 rats ce qui est un minimum suffisant pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

L'aspect des rats et leur comportement seront suivis quotidiennement afin de détecter d'éventuels signes d'inconfort. Par ailleurs, les rats seront pesés toutes les semaines et des prises ou pertes de poids excessives par rapport au poids de départ constituent les points limites de l'expérimentation. Nous collecterons par ailleurs des fèces au début et à la fin de l'expérimentation. À la fin de la période expérimentale, les rats seront euthanasiés et le sang sera prélevé après celle-ci. Enfin post-mortem, l'intestin sera prélevé pour réaliser des analyses histologiques et biomoléculaires permettant d'évaluer les marqueurs de CCR.

Tous les rats auront dans leur cage un enrichissement de milieu par l'ajout de Sopalín (pour faire le nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les rats seront 2 par cage pour éviter l'isolement. 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.

16497 Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) est une cause de mortalité importante dans le monde. Pourtant, aucune thérapie curative n'est disponible sur le marché. Pour combler ce manque et porter l'espoir de guérison aux patients, il apparaît nécessaire d'accroître la connaissance de ce pathogène, et d'apporter de nouvelles approches thérapeutiques.

Pour y parvenir, les chercheurs ont besoin de modèles d'études prédictifs. En utilisant les modèles *in vivo* couramment utilisés, comme le cynomolgus, le risque est grand que les conclusions scientifiques ne soient pas exploitables. En effet, cette espèce ne peut être infectée que par le virus d'immunodéficience simienne (SIV), qui, s'il lui est certes apparenté, présente néanmoins des différences notables avec le HIV, comme son incapacité à infecter l'homme.

Dans ce projet, des souris au système immunitaire humanisé, c'est-à-dire tenant compte du tropisme du HIV pour les lymphocytes T humain, et non humanisé seront infectées avec le virus du HIV. Des candidats médicaments leur seront ensuite administrés, ceci permettra d'étudier, de manière

spécifique, les mécanismes d'action de ce pathogène tout en objectivant les effets qu'auront les molécules thérapeutiques chez l'espèce cible : l'homme.

Réduction : Un total de 3000 souris adultes seront utilisées, couvrant une période 5 ans, permettant de réaliser 100 études précliniques, soit 4 groupes (1 placebo et 3 traitements) de 5 à 10 individus. Le nombre exact d'animaux par étude sera réduit en fonction d'études statistiques adaptées aux effets attendus du candidat médicament.

Raffinement : Les souris seront hébergées en cage ventilée, par groupe social stable. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. La cage contiendra une couche de litière permettant aux souris de creuser, de se cacher et de réaliser un nid, élément essentiel à leur bien-être. Un morceau de bois, permettant aux souris d'exprimer leur comportement de rongeur, ainsi qu'un nid en carton seront également disposés. À leur entrée dans le projet, les souris recevront une période d'acclimatation et seront habituées à la présence de l'expérimentateur qui les manipulera régulièrement. Les pièces d'hébergement disposeront d'un cycle lumière-obscurité (12h - 12h), d'une température (20 - 24°C) et d'une hygrométrie (45 - 65%) contrôlées en permanence.

Remplacement : Les tests *in vitro* seront envisagés si ceux-ci sont appropriés. Néanmoins, il n'est actuellement pas possible de recréer *in vitro* un environnement complexe comme le système immunitaire, et de mimer son interaction avec le HIV, tout en objectivant les effets que pourra avoir un traitement sur un patient humain.

Les études précliniques impliquant des souris au système immunitaire humanisé constituent donc une approche scientifiquement valide, robuste et indispensable au développement et la mise au point de médicaments innovants contre le HIV.

16498 L'atrophie multisystématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative rare et sévère dont la survie est estimée entre 6 et 10 ans.

Des anomalies du métabolisme de l'insuline ont été mises en évidence dans le système nerveux central dans différentes pathologies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, mais également, plus récemment, l'AMS ou la maladie de Parkinson.

Par ailleurs, il semble exister un phénotype d'AMS plus sévère parmi les patients diabétiques présentant une résistance à l'insuline que non diabétique, à l'instar des données épidémiologiques disponibles pour la maladie de Parkinson pour laquelle le diabète semble être à la fois un facteur de risque de survenue d'une maladie de Parkinson et un facteur de sévérité du phénotype.

Dans la littérature, l'existence d'une résistance à l'insuline périphérique dans l'AMS n'est pas documentée et l'impact d'une résistance à l'insuline périphérique sur le processus neurodégénératif est méconnu.

Dans le projet 1, nous évaluerons l'existence d'une résistance à l'insuline périphérique dans le modèle murin d'AMS, par comparaison aux contrôles, le stade de la pathologie auquel cette résistance apparaît éventuellement et l'impact d'un régime alimentaire induisant une insulino-résistance sur la neuropathologie et les altérations comportementales du modèle murin d'AMS.

Dans le projet 2, nous analyserons l'activation de la cascade de signalisation du récepteur à l'insuline au cours d'un test de challenge aigu insulinique dans le modèle murin d'AMS versus contrôle.

Dans le respect de la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 460 souris incluant les groupes expérimentaux et leurs contrôles. Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée actuelle n'indique que l'insuline, aux posologies utilisées, soit susceptible d'entraîner une souffrance chez les animaux et un contrôle glycémique sera réalisé sur point d'appel clinique (convulsions) pour corrections d'éventuelles anomalies glucidiques par apport exogène. Les tests comportementaux réalisés feront appel au comportement moteur spontané de l'animal sans contention. Le bien-être animal sera pris en compte à chaque étape. Pour leur bien être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager ainsi que des traitements vétérinaires si nécessaire.

L'impact de l'induction d'une insulino-résistance sur le comportement moteur et le fonctionnement cérébral ne peuvent être évalué que chez l'animal, ne permettant pas de Remplacer l'utilisation d'animaux par des tests *in vitro*.

460 souris seront étudiées sur 4 ans.

16499 Les lésions de la moelle épinière sont actuellement des maladies incurables qui résultent en une perte totale ou partielle des fonctions motrices, sensibles et sensorielles. De ce fait, la cicatrice qui se met en place après ce type de lésions est décrite comme hermétique à toute régénération nerveuse. Cependant, de récentes études mettent en évidence que la moelle épinière, possède une plasticité intrinsèque sous-évaluée. En effet, récemment il a été démontré qu'il était possible de moduler la cicatrice qui se met en place après lésion médullaire et que la modulation de cette cicatrice permettait de faire repousser les axones et d'induire une récupération fonctionnelle chez ces animaux. Cependant dans ces différentes études, les moyens mis en oeuvre pour moduler la cicatrice étaient invasifs. C'est pour cette raison que notre laboratoire a proposé d'utiliser la stimulation magnétique répétitive comme traitement non-invasif après lésion médullaire chez la souris. Nous avons ainsi pu démontrer que la stimulation magnétique permet de moduler la cicatrice médullaire et d'induire une récupération fonctionnelle chez les animaux qui ont bénéficié de cette thérapie.

Bien que ces résultats nous encouragent à proposer une utilisation de cette technique chez l'Homme, il convient de reproduire ces résultats dans un autre modèle animal. En effet la lésion médullaire chez la souris n'induit pas les mêmes conséquences cellulaires que chez l'Homme, de ce fait il convient de reconduire ces expériences dans un modèle d'étude plus proche de l'Homme. En effet, chez l'homme, la réaction inflammatoire entraîne la formation de cavités qui sont dépourvues en leur centre de cellules. De plus, après une lésion médullaire chez la souris on peut observer une récupération partielle spontanée notamment lors des quinze premiers jours qui suivent la lésion, encore une fois chez l'Homme ce phénomène n'est pas observé.

C'est pourquoi nous proposons ici d'étudier les effets de la stimulation magnétique trans-spinale après lésion médullaire chez le rat. Pour cela, 40 rats seront utilisés : ces 40 rats femelles proviennent d'un fournisseur agréé. Des rats de 8 à 10 semaines seront utilisés afin de réaliser des études histologiques ainsi que des mesures de la récupération fonctionnelle. Un nombre minimum de 20 animaux sera donc inclus dans chaque groupe afin de permettre une étude statistique fiable de manière à limiter les effets induits par la perte des animaux à la suite des actes chirurgicaux ou des infections urinaires.

Les rats seront opérés sous anesthésie générale. Conformément au principe de l'éthique animal reposant sur la règle des 3R, le nombre d'animaux a été évalué à partir d'études proches de celles-ci précédemment effectuées dans notre laboratoire et dont les statistiques avaient été établies pour réduire au minimum le nombre d'animaux opérés. De même les conditions d'hébergement, de soins, d'antalgie et les méthodes utilisées seront adaptées pour réduire le plus possibles toutes douleurs, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux de manière à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux conformément aux normes actuelles encadrant l'éthique animale. Ces derniers seront observés quotidiennement durant toute la durée du protocole expérimental et seront massés afin de permettre une vidange vésicale deux fois par jour pendant au moins 15 jours Nous mettrons en place des points limites basés sur différents critères objectifs (expressions faciales du rat, perte de poids importante etc.).

Tout signe de souffrance entraînera la mise à mort des animaux.

16500 Les troubles dépressifs sont une des premières causes d'invalidité dans le monde. L'efficacité des antidépresseurs est cependant insuffisante chez une grande partie des patients. Ainsi, le stress et les troubles associés posent un problème majeur de santé publique, nécessitant une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents et la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces. La stimulation cérébrale magnétique transcrânienne répétée (rTMS), qui consiste à appliquer une série d'impulsions magnétiques sur le scalp pour modifier durablement l'activité de la région corticale visée, en particulier le cortex préfrontal (PFC) dans la dépression majeure, constitue une approche alternative prometteuse. Notre équipe a implémentée son utilisation chez la souris, et démontré son efficacité à contrecarrer les effets comportementaux d'un

modèle de dépression, le stress chronique imprédictible (UCMS). L'objectif des expériences proposées est de mieux comprendre les circuits neuronaux impliqués dans ces effets comportementaux, en particulier dans les régions du cerveau communément altérées dans la dépression, telles que le PFC, l'hippocampe ventral (vHPC), l'amygdale (AMY) et le striatum dorsal (DStr). La souris est de ce fait le modèle le plus pertinent, de par l'homologie de structure entre ces différentes structures participant au contrôle des émotions et impliquées dans la dépression, l'accessibilité des outils permettant de manipuler l'activité neuronale de façon ciblée, et la pertinence du modèle UCMS.

L'effectif total maximum pour la totalité du projet de cette saisine est de 225 souris. Concernant l'application de la règle des 3 R dans notre étude:

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée Le stress 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 analyses tissulaires nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=15 sujets par groupe expérimental). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

Raffinement : Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanons plexiglass et cartons, 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 thermorégulée 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.

16501 Les glomérulonéphrites (GN) à complexes immuns, comme la néphropathie à IgA ou la maladie rénale liée au lupus, sont un groupe de maladies du rein caractérisées par des lésions responsables d'une destruction du tissu rénal, entraînant ainsi une mauvaise filtration du sang et une accumulation de molécules toxiques dans le sang. Ces maladies peuvent être graves menant à une destruction définitive du rein appelée insuffisance rénale chronique terminale (par conséquent la nécessité de dialyse ou de transplantation rénale) mais également un risque de décès des patients atteints.

Il n'existe actuellement pas de données claires sur les causes de ces maladies. Aucun traitement médicamenteux spécifique n'a donc pu être développé pour les guérir.

Le but de ce projet est donc d'identifier les molécules responsables de la destruction du rein dans plusieurs modèles de maladies rénales, afin de pouvoir les cibler spécifiquement par un médicament et empêcher ainsi le développement et l'aggravation de la maladie rénale.

Le premier objectif du projet est de comprendre le rôle de plusieurs protéines dans le développement de ces maladies rénales.

Il est donc essentiel de développer des animaux ayant soit la présence soit l'absence de ces molécules. Le modèle de souris que nous utilisons est le modèle appelé anti-GBM : il s'agit d'injecter aux souris des anticorps entraînant le développement de la maladie rénale. Nous analyserons ensuite l'effet de la présence ou de l'absence de telle ou telle molécule dans différents types de souris sur le développement de la maladie.

Ce projet se déroulera sur une période de 5 ans.

Ce projet nécessitera un nombre total de 462 souris.

L'ensemble des souris qui seront utilisées dans ce projet ne présentent pas un phénotype dommageable.

La conformité avec les exigences de réduction, raffinement et remplacement seront pris en compte :

1) Remplacement : Au sein de notre équipe, nous avons développé des lignées cellulaires qui surexpriment les différentes molécules. Ces lignées vont permettre d'étudier le rôle de ces protéines dans la régulation de l'inflammation lors de ces maladies rénales.

Cependant, pour étudier le rôle de ces protéines sur la fonction rénale, nous aurons besoin d'un modèle animal puisqu'aucun autre modèle (cellulaire) ne permet aujourd'hui d'évaluer la fonction rénale lors de ces maladies.

2) Réduction : dans ces différents modèles, le taux de mortalité est faible (environ 10%), nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables à 6 par sous- groupe.

3) Raffinement : les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une période d'acclimatation d'au moins 5 jours dans les mêmes conditions environnementales que celles qui prévaudront lors du protocole expérimental est prévue afin de stabiliser les animaux au point de vue physiologique et comportemental et de diminuer leur stress. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal et l'utilisation d'antalgiques sera envisagée si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. Les signes extérieurs de souffrance (perte de poids au-delà de 20-25 % par rapport au groupe contrôle, prostration, poil hérissé, saignements) seront les critères de point limites à partir desquels nous procéderons à l'euthanasie de l'animal.

16502

Le syndrome urémique se caractérise par l'accumulation de toxines urémiques qui jouent un rôle majeur dans les complications cardiovasculaires associées à l'insuffisance rénale chronique (IRC) et à la progression de celle-ci. Ces toxines urémiques sont issues de la biotransformation de certains acides aminés présents dans les protéines alimentaires (tels que la tyrosine, le tryptophane ou la phénylalanine) par les bactéries intestinales. Ces toxines sont peu éliminées par la dialyse. Une des stratégies possibles pour diminuer la production des toxines urémiques serait de diminuer l'apport alimentaire des précurseurs de ces toxines tel que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Les régimes pauvres en protéines (0.6g/kg/j) sont prescrits en pratique courante chez les patients IRC et ils ont démontré des effets bénéfiques sur la progression de l'IRC. Ces régimes hypoprotéiques sont régulièrement remis en cause du fait du problème d'observance et des risques élevés de dénutrition. Les mécanismes par lesquels ils agissent sont en outre mal compris.

Cette étude a pour but d'évaluer le rôle bénéfique de régimes dépourvus seulement de 3 acides aminés (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) dans un modèle de souris urémique sur la fonction rénale et la production des toxines urémiques.

Ces régimes seront administrés pendant 5 semaines. Quatre groupes de 8 souris mâles C57bl6J seront utilisées soit un total de 32 souris (24 souris urémiques et 8 souris contrôles).

Remplacer: Il est nécessaire de recourir à une étude *in vivo* pour étudier l'impact des régimes sur l'ensemble de ces paramètres étant donné l'impact systémique de l'IRC. Toute expérimentation *in vitro* et/ou méthode substitutive est donc impossible.

Résuire : Le nombre d'animaux nécessaires à ces études a été calculé au plus juste afin d'offrir la puissance statistique maximum pour répondre à la question.

Raffiner: La présente étude est raffinée par l'utilisation d'un modèle non chirurgical pour induire l'IRC qui ne s'accompagne d'aucune douleur ou détresse pour les animaux à comparaison du modèle chirurgical traditionnel de néphrectomie. Cette technique évite ainsi d'avoir recours à une chirurgie pour induire une IRC (technique classique de néphrectomie des 5/6 nécessitant deux interventions chirurgicales) et permet de supprimer la mortalité et la douleur post-opératoire. Un enrichissement du milieu de vie sera mis en œuvre pour l'hébergement des souris. Les animaux seront maintenus par 4 afin d'éviter le stress de l'isolement et, les souris seront surveillées trois fois par semaine afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être.

16503 Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des cancers rares caractérisés par une production excessive de la lignée myéloïde. Cette lignée donne naissance aux plaquettes qui contribuent au processus de coagulation du sang, aux globules rouges qui transportent l'oxygène, et aux deux types de globules blancs : les granulocytes (ou polynucléaires) et les monocytes qui jouent un rôle dans le

système immunitaire en luttant contre les infections. La maladie est due à une mutation JAK2 V617F retrouvée dans les cellules du sang.

Récemment il a été rapporté qu'au cours des SMP, la mutation JAK2 V617F est également retrouvée dans les cellules endothéliales des patients. Les cellules endothéliales sont les composants de la paroi interne des vaisseaux sanguins. Deux traitements existent actuellement: l'hydroxyurée (HU), pour empêcher la croissance des cellules cancéreuses, (ce qui mène à leur destruction) et le ruxolitinib pour bloquer spécifiquement JAK2 V617F et donc le processus inflammatoire qui en découle.

Ces dernières années de nombreuses études tentent de faire la lumière sur les complications vasculaires rencontrées au cours des SMP. L'athérosclérose a fait l'objet de nombreuses études et semble être augmentée chez les patients porteurs de la mutation JAK2V617. L'anévrisme est peu étudié dans ce contexte. Cependant, les patients atteints de SMP présentent un risque de complications vasculaires élevé pouvant être associé à un risque de dilatation/dissection aortique de l'aorte abdominale, dont l'origine est peu élucidée et semble multifactorielle. Ces observations ont été corroborées par des études chez l'animal et suggèrent que les changements qualitatifs affectant les cellules sanguines peuvent affecter les cellules endothéliales et contribuer au développement de ces complications.

Notre projet a pour but d'étudier les mécanismes à l'origine des dissections aortiques. Nous essaierons de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu ainsi que d'étudier la réponse inflammatoire au cours de la mutation JAK2V617F. Les anévrismes commencent par se manifester par une dilatation aortique qui au cours du temps est responsable de la dégradation de la paroi aortique et peut mener à la rupture de l'aorte. Seule l'expérimentation *in vivo*, qui mime de façon fidèle la complexité de la pathologie nous permettra de mettre en lumière les acteurs clés impliqués.

Pour cela, nous utiliserons quatre modèles transgéniques murins expérimentaux de SMP obtenus par croisement au sein du laboratoire. Cela nous permettra d'identifier quel compartiment cellulaire portant la mutation est responsable des anévrismes disséquants rencontrés au cours des SMP.

Nous vérifierons si chaque modèle exprime bien un SMP par une numération formule sanguine. Celle-ci nécessite un prélèvement sanguin indolore de faible volume que nous réaliserons sous anesthésie gazeuse pour éviter l'angoisse de l'animal. Nous étudierons le diamètre aortique par échographie sous anesthésie gazeuse. Nous étudierons également l'infiltration de l'aorte par des cellules inflammatoires. Cette étude nécessite le prélèvement de l'aorte qui sera réalisé sur animal mis à mort après anesthésie.

Dans un deuxième temps, nous traiterons les animaux par HU ou ruxolitinib pour vérifier si les traitements empêchent le développement des anévrismes disséquants. L'HU est administrée quotidiennement par injection intrapéritonéale et est indolore. Le ruxolitinib est administré bi-quotidiennement. Les animaux traités seront suivis 4 mois durant lesquels une numération formule sanguine sera réalisée mensuellement et une échographie à la fin du traitement. Les animaux seront mis à mort et l'aorte sera prélevée et étudiée.

Dans un troisième temps nous réaliserons une transplantation de moelle osseuse. Cette technique permet d'étudier de manière spécifique l'implication de la mutation JAK2V617F dans les cellules du sang produites par la moelle osseuse. Elle permettra de confirmer les résultats obtenus dans les modèles spécifiques.

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'angoisse des animaux seront prises (Raffinement). Ainsi, les prélèvements sanguins, les échographies, les injections se feront sous anesthésie générale gazeuse et les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil complet.

Aucune méthode alternative *in vitro* ne permet d'étudier la complexité des anévrismes disséquants qui se composent d'une succession de plusieurs événements inflammatoires affectant l'aorte (Remplacement).

Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total 736 souris.

Les résultats de ce projet nous permettront de comprendre les mécanismes impliqués dans la formation des anévrismes disséquants liés à la mutation JAK2V617F et la participation des différents types cellulaires engagés dans ce processus.

16504 Nous effectuerons ces expériences afin de mieux comprendre le rôle des ganglions de la base (GB) dans le contrôle du mouvement et de la cognition. Certains des noyaux du GB, notamment le noyau subthalamique (NST) et le globus pallidus interne (GPi), sont des cibles de choix du traitement neurochirurgical par stimulation cérébrale profonde (SCP) des maladies comme la maladie de Parkinson (MP) ou les troubles obsessionnels compulsifs. La MP provoque des symptômes moteurs invalidants suite à la perte de neurones dopaminergiques au sein des noyaux mesencephaliques. Ces symptômes sont améliorés significativement par la SCP. Cependant, des effets secondaires peuvent survenir, source de handicaps. Ceci souligne le manque de compréhension du mode d'action de la SCP et du rôle du NST et GPi. Comprendre le rôle de ces structures apparaît primordial pour améliorer la SCP. L'objectif de nos expériences est de caractériser le rôle des noyaux du GB et leurs afférences au thalamus et au cortex dans la préparation, la sélection, l'initiation et l'exécution du mouvement. Nous enregistrerons l'activité neuronale des noyaux du GB et afférences corticales chez le singe normal et rendu légèrement parkinsonien. Comprendre comment ces zones initient et guident les comportements à l'état normal et parkinsonien offrira une meilleure compréhension du système et pourrait permettre d'améliorer le traitement neurochirurgical par stimulation profonde chez les patients.

Ces travaux impliquent 10 singes macaques. L'utilisation de primates pour notre projet est essentielle car notre objectif est de comparer directement les résultats obtenus chez l'homme et l'animal pour des expériences menées en parallèle. D'une façon générale, les similitudes relatives entre les modes d'action et de perception des primates humains et non humains facilitera grandement cette comparaison, qui se révèle parfois impossible avec d'autres espèces. De plus, l'un des objectifs majeurs de notre projet de recherche est de comprendre la pathophysiologie de la maladie de Parkinson. Pour cela, nous utiliserons un modèle singe de la maladie, ce modèle s'étant avéré essentiel pour le développement de la stimulation cérébrale profonde chez les patients parkinsoniens. Il reste le meilleur modèle animal de la maladie, puisqu'il développe de façon reproductible les symptômes cardinaux de la maladie, ce qui est crucial pour établir des comparaisons avec les données obtenues chez l'homme. Le modèle primate est donc le plus prédictif et le plus pertinent pour espérer une transposition à l'homme la plus fiable possible. Les animaux sont élevés en groupe, ce qui permet un bon maintien de leurs relations sociales et ainsi de leur bien-être, et nous prévoyons, lorsque cela est possible, de les réhabiliter dans un centres d'accueil agréé.

Afin de maximiser le bien-être de nos animaux, notre projet intègre de nombreux aspects se conformant à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacement: Notre projet de recherche vise à comprendre les corrélations entre comportement et activité neuronale aux différents stades de la maladie de Parkinson. Nous avons prévu d'étudier les stades débutants de la maladie de Parkinson chez des singes commençant à présenter quelques symptômes (légère lenteur, rigidité très modérée). Parallèlement, nous étudierons les stades avancés de la maladie directement chez des patients consentants pendant la chirurgie d'implantation d'électrodes de stimulation cérébrale profonde. Ceci nous permettra donc de remplacer l'utilisation des animaux dévolus à ce programme de recherche et de diminuer ainsi considérablement les souffrances des animaux, ces derniers ne présentant jamais les symptômes lourds de stades avancés de la maladie.

Réduction: Notre projet de recherche s'intéresse au cerveau normal et pathologique. Afin de minimiser le nombre d'animaux, nous utiliserons une approche « intra-sujet », où les enregistrements électrophysiologiques seront collectés chez chaque singe à l'état contrôle puis parkinsonien. Ainsi nous n'utilisons pas de groupe contrôle puisque chaque animal est son propre contrôle, ce qui permet de réduire le nombre total d'animaux. Nous estimons que 10 animaux suffiront (3 animaux pour étudier le NST, 3 animaux pour étudier le GPi, 3 animaux pour étudier les interactions des ganglions de la base avec le cortex et 1 animal supplémentaire en cas de problème chirurgical). Nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées, et en particulier des modèles mixtes, augmentant ainsi notre puissance statistique par une analyse de données dites répétées, ou longitudinales, non gaussiennes.

Raffinement : Les singes sont des animaux sociaux, et sont donc hébergés par paire ou groupe plus large dans la mesure du possible. Les cages sont de plus équipées d'un panneau de communication latéral transparent, permettant à tous les animaux de communiquer d'une cage à l'autre. Nous avons mis en place un programme d'enrichissement dans les cages destinées aux singes. Nous leur mettons par exemple à disposition des jouets, friandises, perchoirs ou autres éléments comme des litières de copeaux de bois dans lequel nous cachons graines et autres aliments que les animaux se plaisent à rechercher.

1. L'entraînement des animaux sur nos tâches comportementales sera axé sur un renforcement positif à base de nourriture qu'ils apprécient particulièrement. Aucune restriction hydrique ne sera appliquée.
2. L'enrichissement cognitif des animaux sera assuré tout au long de leur séjour au sein de l'animalerie par la manipulation de jouets, la mise en place de résolution de problèmes simples au cours des entraînements et la capacité de contrôler leur environnement puisque les animaux pourront choisir de se désengager à tous moments de ces activités.
3. Les animaux sont observés quotidiennement (volière d'hébergement et box expérimentaux) afin de détecter tout signe d'inconfort débutant.
4. Contrairement à de nombreuses études neurophysiologiques, les animaux ne seront pas euthanasiés lorsque la procédure expérimentale le permettra grâce à l'acquisition d'image IRM nous permettant de localiser de manière non-invasive nos cibles neurales.
5. Tous les entraînements seront progressifs et permettront aux animaux de s'adapter graduellement aux conditions nécessaires pour l'acquisition de nos données (plusieurs mois, entraînement quotidien, etc.).
6. Les procédures chirurgicales seront optimisées en collaboration avec une équipe de neurochirurgiens afin de minimiser leur impact (durée, nombre, etc.).

16505 La maladie de Parkinson est la maladie neurodégénérative la plus répandue après la maladie d'Alzheimer. Elle se caractérise par des troubles importants de la motricité qui sont causés par la mort des neurones dopaminergiques d'un noyau cérébral appelé substance noire compacte. A ce jour, toutes les stratégies essayées pour empêcher ou ralentir la progression de la maladie ont échoué. Ces échecs sont notamment dus au fait que les symptômes moteurs apparaissent uniquement lorsque 60 à 70% des neurones dopaminergiques ont disparu : il est donc déjà trop tard pour intervenir. Il faudrait donc pouvoir diagnostiquer la maladie avant que les symptômes moteurs n'apparaissent, pendant la phase « silencieuse » de neurodégénérescence. Une solution est de trouver des marqueurs circulants (car identifiables à partir d'une simple prise de sang) précoces de la maladie. Cette approche est difficile, voire impossible chez l'homme puisque nous ne savons pas diagnostiquer la maladie avant l'apparition des problèmes moteurs. Par contre, chez l'animal, nous pouvons contrôler le degré de perte de neurones dopaminergiques et ainsi étudier différents marqueurs à un stade pré-moteur de la maladie, quand la disparition des neurones dopaminergiques n'est pas encore assez importante pour induire des déficits moteurs. Cette étude nous permettra également d'étudier l'effet de différents traitements sur ces marqueurs, puisqu'ils peuvent être utilisés également comme des outils très efficaces et objectifs pour évaluer les bénéfices et effets secondaires de nouvelles molécules. Cette nouvelle version du projet a pour objectif de tester également l'effet, sur ces marqueurs, d'une nouvelle molécule ayant potentiellement des propriétés neuroprotectrices.

Le rat apparaît comme le modèle de choix pour ce projet compte-tenu de la similarité de l'organisation anatomo-fonctionnelle de son cerveau avec celle de l'homme et de l'existence chez cette espèce de plusieurs modèles pré-moteurs bien caractérisés de la maladie de Parkinson. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (4 procédures expérimentales) est de 256.

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. Un suivi longitudinal permettra de répéter certaines mesures afin de diminuer le nombre d'animaux nécessaires par groupe.

Ce projet implique de la neurochirurgie et certaines tâches comportementales de classe modérée. La chirurgie 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 apparaissent.

Le projet traitant d'une maladie cérébrale complexe et nécessitant des approches comportementales, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

16506 La majeure partie des traitements médicamenteux concernant les troubles neurologiques agissent sur des processus neuronaux. Cependant de plus en plus d'études montrent qu'agir sur les astrocytes (cellules gliales) durant des périodes clés du développement cérébral affecte le fonctionnement neuronal et permet ainsi de traiter certaines affections émotionnelles et/ou cognitives. Dans ce projet, nous évaluerons l'efficacité d'une molécule ciblant les astrocytes à traiter des déficits de mémoire présents chez la souris LgDel, modèle de syndrome de délétion 22q11, caractérisée par des altérations de mémoire de travail et une hyperactivité locomotrice, mais ne présentant par ailleurs aucun phénotype dommageable. Conformément à la littérature et à ce que montrent nos précédents travaux, la molécule sera administrée par voie intracérébrale (dans le cortex préfrontal) entre P35 (jour postnatal 35) et P45 via des mini-pompes osmotiques permettant une délivrance chronique du composé sans intervention de l'expérimentateur. Ces mini-pompes sont constituées d'une canule d'infusion implantée par chirurgie stéréotaxique dans la structure d'intérêt et fixée à la surface du crâne par du ciment dentaire, 2) d'un réservoir contenant la molécule à infuser (implanté en sous-cutané à l'arrière de la tête comme indiqué par le fabricant) et 3) d'un cathéter reliant la canule d'infusion au réservoir (implanté également en sous-cutané). L'efficacité de cette stratégie thérapeutique sera vérifiée en réalisant une étude comportementale à l'âge de 3-4 mois visant à voir si ce traitement restaure de façon durable les déficits de mémoire de travail. Ce projet nécessitera donc de réaliser des accouplements (mâles hétérozygotes vs femelles WT) afin de générer les cohortes d'animaux WT et hétérozygotes nécessaires à la bonne réalisation de l'étude. Nous estimons le nombre total d'animaux à 72 maximum.

Dans ce projet, il sera porté une attention au respect de la règle des 3R :

- Remplacer : L'efficacité de la molécule à agir spécifiquement sur les astrocytes a préalablement été validée *in vitro* à partir notamment de co-cultures primaires de neurones et d'astrocytes. - Réduire : Les expériences déjà menées *in vitro* et *in vivo* nous permettent de n'utiliser qu'une seule dose du composé d'intérêt, évitant ainsi la réalisation d'une étude classique « effet – dose » impliquant beaucoup plus d'animaux.

- Raffiner : 1) Enrichissement de l'hébergement: les animaux auront à leur disposition des éléments leur permettant d'exprimer leur comportement naturel (tubes de coton, tubes en carton et abris en PVC). 2) Technique d'administration: mini-pompes osmotiques) : permet de réduire de façon significative la manipulation des animaux par l'expérimentateur : les mini-pompes délivrent automatiquement la solution qu'elles contiennent selon une vitesse inhérente à leur constitution. Cette technique permettra donc de délivrer de façon constante une certaine quantité de produit durant 10 jours consécutifs sans intervention de l'expérimentateur.

3) Gestion de la douleur : Un traitement analgésique préopératoire sera utilisé permettant de supprimer la douleur en cours d'opération ainsi que durant les 6-12h postopératoires. En post-opératoire, un traitement par antalgique sera mis en place via l'eau de boisson. Les animaux seront également suivis quotidiennement tout au long de la procédure (weekends inclus), dès l'implantation des minipompes et jusqu'à la phase d'évaluation comportementale : tous les jours l'aspect général de l'animal (posture, pelage, démarche, expressions faciales, plissement des yeux) sera observé, associé au suivi des critères évalués par la grille de score adaptée aux tests. Si des animaux présentent des signes de souffrance ils seront soit traités par antalgique soit retirés du groupe expérimental et mis à mort, selon le point limite atteint.

16507 Le fonctionnement cérébral, ainsi que l'ensemble de nos comportements, dépendent de la mise en place ordonnée des circuits neuronaux pendant le développement. Les neurones sérotoninergiques se développent très tôt pendant la vie embryonnaire. Ils influencent ainsi de nombreux processus

neurodéveloppementaux, tels que la production de neurones ou la formation des synapses, et par conséquent, la construction des circuits neuronaux qui contrôlent les comportements. Chez l'adulte, la neurotransmission sérotoninergique est également impliquée dans la régulation d'un très grand nombre de processus physiologiques, dont la perturbation est associée à différents troubles comportementaux et à des pathologies anxiodépressives et cognitives.

Ainsi, des défauts de comportement maternel ont été observés dans différentes lignées de souris présentant une réduction des niveaux de sérotonine plus ou moins importante (lignées hypo-sérotoninergiques), mais le rôle de la 5-HT dans l'initiation et/ou le maintien de ce comportement social est inconnu.

Par ailleurs, la neurogenèse adulte, une forme de neuroplasticité extrême ayant un rôle central dans le fonctionnement de certains processus mnésiques, est également modifiée chez ces modèles murins hypo-sérotoninergiques.

Les objectifs de ce projet sont donc d'étudier l'implication de la sérotonine dans l'expression de comportements sociaux (alloparental) et dans les processus d'apprentissage et de mémoire impliquant la neurogenèse adulte de l'hippocampe. Nous anticipons l'utilisation de 192 souris (transgéniques et sauvages) sur une durée de 5 ans pour la réalisation de ce projet.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3 R, à savoir :

- Remplacement : Les comportements étudiés étant très complexes, le remplacement de l'expérimentation animale n'est, ici, pas envisageable.
- Réduction : Nous réduisons le nombre d'animaux en incluant dans une procédure la grande majorité des animaux issus de l'élevage. Ainsi, les couples de reproduction sont choisis de façon à ce que les animaux contrôles proviennent des mêmes portées que les animaux mutants. De plus, les femelles seront utilisées pour l'étude du comportement alloparental, tandis que la caractérisation de la neurogenèse adulte hippocampique et l'analyse des processus mnésiques dépendant de cette neuroplasticité seront réalisés sur les mâles.

Enfin, un même animal est utilisé successivement pour des études de comportement, puis pour des études anatomiques et/ou biochimiques.

Le nombre minimal d'animaux nécessaire à confirmer ou infirmer notre hypothèse de départ est calculé au plus juste par expérience, tout en permettant l'obtention d'une réponse statistiquement valide.

- Raffinement : Les animaux sont maintenus en environnement enrichi et en groupe de 2/3 individus. Seules les femelles en fin de gestation et avec petits sont transitoirement isolées dans des cages.

Pour limiter autant que possible la douleur de l'animal si elle survient lors des procédures, des anesthésiques et des anti-inflammatoires seront administrés avec un suivi fréquent de l'animal pendant et après le protocole.

16508 La recherche médicale dans le domaine préclinique nécessite un suivi étroit des paramètres physiologiques des animaux utilisés lors des essais. La sonde permettant le recueil des données nécessaires est appelée sonde télémétrique. Cette sonde permet de suivre des animaux en temps réel et de manière continue (24h/24 et 7j/7) en mesurant différents paramètres physiologiques en fonction de la sonde utilisée (fonctions cardiaques, respiratoires, neurologiques, l'activité des organes impliqués dans le métabolisme, etc.). Une chirurgie est nécessaire pour mettre en place la sonde télémétrique.

Le système s'appuie sur des mesures à très haute résolution, grâce à un émetteur et un récepteur par liaison sans fil. Les données physiologiques sont ainsi enregistrées et visualisables via un logiciel sur ordinateur ou tablette.

Les principaux bénéfices de l'implantation de sondes télémétriques sont :

- Réduction du nombre d'animaux dans les procédures
- Mesures automatisées jour et nuit
- Préservation de la physiologie des animaux et minimisation du stress lié à l'expérimentateur (mesures à distance), animaux libres de leurs mouvements
- Surveillance et réactivité en cas d'anomalie

- Ne provoquent aucune infection contrairement aux implantations de cathéters, car le dispositif est à l'intérieur du corps sans voie d'entrée de pathogène après la pose
- Simplicité et rapidité du logiciel, simple d'utilisation

Le but de ce projet est de pouvoir proposer des modèles animaux préalablement implantés avec une sonde télémétrique. En fonction des besoins, la sonde utilisée permettra de suivre en temps réel les paramètres physiologiques souhaités. Cette phase animale est indispensable pour mettre en place le dispositif médical et aucune méthode alternative n'est possible actuellement. Ce projet est en fait une phase initiale d'implantation de sondes télémétriques à des animaux qui sont ensuite utilisés dans des projets en recherche pharmacologique dans d'autres établissements. Notre laboratoire propose son expertise dans la pose de ces systèmes pour d'autres laboratoires. En fonction des demandes, nous pourrions, sur 5 ans, implanter au maximum, jusqu'à 300 chiens et 300 porcs, sachant que ces animaux seront donc comptabilisés également dans d'autres projets.

Toutes les compétences sont mises en œuvre pour limiter au maximum la douleur que l'implantation peut occasionner aux animaux. C'est une chirurgie simple et rapide, sous anesthésie générale avec une couverture analgésique attentive. Les animaux sont hébergés dans le respect de leurs besoins éthologiques avec enrichissement du milieu. Si nous les hébergeons seuls, le temps d'isolement est limité au strict nécessaire. Un suivi clinique étroit après l'intervention chirurgicale est réalisé quotidiennement par des techniciens animaliers et des vétérinaires, avec mise en place d'un protocole analgésique adapté pendant plusieurs jours. De plus, des points limites suffisamment prédictifs sont définis permettant de sortir un animal de l'étude si la souffrance engendrée est trop importante.

16509 Le neuroblastome est la tumeur solide extra-cérébrale la plus fréquente chez l'enfant : 150 nouveaux cas environ sont diagnostiqués chaque année en France. Les tumeurs apparaissent en général dans l'abdomen à proximité de l'aorte, le long de la chaîne nerveuse sympathique ou dans les glandes adrénales. Le pronostic est très variable et dépend de nombreux paramètres, et notamment de l'âge au diagnostic et de la présence de métastases. Malgré l'utilisation d'une combinaison de traitements agressifs et la mise en œuvre de nombreux essais cliniques, près de la moitié des enfants et adolescents atteints de neuroblastomes de haut-grade ne survivent pas. Il est donc urgent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces tumeurs, pour développer de nouveaux traitements, plus efficaces et moins toxiques.

La résistance des neuroblastomes aux chimiothérapies conventionnelles a été associée à un blocage des voies de mort cellulaire dites classiques. En effet, lorsqu'une cellule devient anormale, se retrouve hors de son tissu ou est en excès, elle est normalement éliminée par l'activation de signaux internes aboutissant à la mort cellulaire. La capacité à résister au déclenchement de sa propre mort est l'une des caractéristiques acquises par les cellules tumorales, et les neuroblastomes ne font pas exception à la règle. Afin d'améliorer la prise en charge médicale des neuroblastomes chez l'enfant et l'adolescent, notre projet a pour objectif de définir l'efficacité d'une thérapie basée sur l'activation d'une voie alternative de mort cellulaire, à l'aide d'un modèle de greffes de cellules de neuroblastomes chez des souris immunodéficientes âgées de 6 semaines (PROCEDURE 1). Cette voie alternative étant susceptible de déclencher une réponse immunitaire, nous étudierons également son efficacité en combinaison avec des immunothérapies afin de définir le potentiel thérapeutique de cette combinaison. Pour cela, des cellules de neuroblastomes de souris seront greffées dans des souris possédant un système immunitaire fonctionnel âgées de 2, 4 et 6 semaines pour étudier la réponse immunitaire à différents âges (PROCEDURE 2). Dans les deux cas, l'implantation tumorale ne dépassera pas 5 semaines.

Dans ce projet nous utiliserons au total 246 souris (30 souris immunodéficientes en PROCEDURE 1 et 216 souris immunocompétentes en PROCEDURE 2). Les deux procédures ont été élaborées pour respecter la règle des 3R

(Réduire, Remplacer et Raffiner) :

-Réduire : Le nombre de souris a été réduit au maximum dans les deux procédures afin de permettre une analyse statistique optimale des mesures de prise et de croissance tumorale entre les groupes contenant le minimum de souris.

-Remplacer : Le projet sur les souris a été repoussé le plus possible afin d'avoir le maximum de données possible sur des cellules au laboratoire.

-Raffiner : Pour mimer l'habitat naturel des souris, du coton et des copeaux de cartons seront mis à leur disposition. Les souris des deux procédures seront suivies tous les deux jours par deux expérimentateurs formés, afin d'anticiper toute douleur. Dans les deux procédures, l'implantation tumorale ne dépassera pas 5 semaines et un traitement

analgésique est prévu si la souris montre tout signe de douleur.

16510 L'objectif principal de ce projet est de comprendre le rôle du récepteur minéralocorticoïde (MR), un récepteur aux glucocorticoïdes, dans le processus de développement et du maintien de la myéline. La myéline est une gaine isolante entourant les axones formant les nerfs et est nécessaire à une bonne coordination motrice. Une meilleure compréhension du rôle du MR dans la myélinisation permettrait le développement de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement des maladies démyélinisantes, comme la maladie de Charcot-Marie Tooth par exemple. Le projet consiste à analyser les conséquences de l'absence du gène codant pour le MR chez la souris. Pour cela, nous utiliserons des souris transgéniques invalidées pour ce gène spécifiquement dans les cellules de Schwann (responsables de la mise en place et du maintien de la myéline). Les capacités locomotrices de ces souris seront testées durant le processus de myélinisation (qui se déroule principalement pendant les 3 premières semaines de vie de la souris) et à l'âge adulte (12 semaines, 16 semaines et 6 mois). Nous réaliserons différents tests comportementaux visant à analyser leurs capacités locomotrices ou leur sensibilité nerveuse. Nous mesurerons également le potentiel d'action musculaire par le biais d'électromyogrammes. Cette procédure non invasive sera effectuée sous anesthésie générale pour éviter tout risque de douleur. La même série de tests sera effectuée en parallèle avec des cohortes d'animaux âgés de 12 semaines qui auront subi une compression du nerf sciatique sous anesthésie afin d'étudier le processus de remyélinisation. Un suivi post opératoire avec administration d'anti-douleurs sera effectué. Afin d'être en conformité avec les exigences des 3R, nous allons utiliser le minimum d'animaux en expérimentation en prélevant le maximum de tissus biologiques sur chaque animal et en utilisant les tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous allons également raffiner l'étude en évitant des tests comportementaux douloureux, en réduisant la durée de l'étude au maximum et en appliquant des points limites notamment la mise à mort des souris en cas de souffrance majeure. Enfin, en complément de ces études *in vivo*, nous utiliserons des méthodes *in vitro* de culture de cellules (lignées établies et cultures primaires de cellules de Schwann de souris) afin d'identifier les cibles du MR, nous permettant de mieux comprendre le rôle de ces gènes sur la myéline et dans ce cas là de remplacer le modèle animal. Au total nous avons donc besoin de 1030 animaux pour une étude qui s'étend sur 5 ans

16511 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. 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

vieillesse 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).

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.

16512 En élevage avicole, un des enjeux est d'empêcher l'apparition de coccidioses, maladies causées par le développement de parasites intestinaux, du genre *Eimeria*, qui affectent le bien-être des poulets, utilisent les nutriments apportés par l'aliment au détriment de l'animal et abîment la muqueuse intestinale. Ils entraînent une dégradation des conditions de vie des poulets. Les animaux sont affaiblis, prostrés et peuvent souffrir de diarrhées qui génèrent une humidité de la litière et donc des brûlures des pattes (pododermatites). On observe des retards de croissance, une diminution de l'efficacité alimentaire (capacité du poulet à convertir les aliments en poids vif) et dans des cas extrêmes, de la mortalité. Le contrôle de ces parasites est donc indispensable. Parmi les méthodes de contrôle figurent la vaccination et l'utilisation d'additifs anticoccidiens dont certains se rapprochent de la famille des antibiotiques. L'attente sociétale évolue et les consommateurs sont de plus en plus attentifs à la qualité des produits carnés qu'ils consomment. Le bien-être des animaux d'élevage et la réduction de l'utilisation de médicaments sont au centre de leurs préoccupations. C'est pourquoi nous souhaitons pour notre production de poulets Label Rouge, dont l'image est déjà très bonne, aller encore plus loin en substituant certains des additifs de traitements de la coccidiose actuellement utilisés par des additifs minéraux ou issus de composés extraits de plantes.

La finalité de cette étude est de développer des moyens de lutte alternatifs contre la coccidiose. Nous évaluerons l'efficacité de 3 stratégies de prévention anticoccidienne alternatives (lots 3, 4 et 5) en comparaison d'une stratégie de vaccination (lot 6), chez 960 poulets de chair label, soumis à une inoculation parasitaire expérimentale. Les résultats seront comparés à ceux des 480 poulets sans protection anticoccidienne (lots contrôles 1 et 2), exposés ou non aux parasites. Cela représente un total de 1440 poulets inclus dans l'étude soit 240 poulets répartis dans 6 parquets de 40 poulets par lot.

- lot 1 contrôle positif : 240 poulets sans traitement anticoccidien et non exposés aux parasites
- lot 2 contrôle négatif : 240 poulets sans traitement anticoccidien et exposés aux parasites par inoculation
- lot 3 stratégie anticoccidienne produit 1: 240 poulets recevant, via l'alimentation, un traitement anticoccidien préventif et alternatif de type minéral (additif du commerce), et exposés aux parasites par inoculation
- lot 4 stratégie anticoccidienne produit 2 : 240 poulets recevant, via l'alimentation, un traitement anticoccidien préventif et alternatif à base de composés végétaux (additif du commerce), et exposés aux parasites par inoculation

- lot 5 stratégie anticoccidienne produit 3 : 240 poulets recevant, via l'alimentation, un traitement anticoccidien préventif et alternatif à base d'un second mélange de composés végétaux (additif du commerce), et exposés aux parasites par inoculation

- lot 6 stratégie anticoccidienne vaccinale : 240 poulets soumis à une vaccination anticoccidienne au couvoir dès l'éclosion (pas de programme alimentaire préventif), et exposés aux parasites par inoculation

A 15 jours d'âge, chaque animal des lots 2 à 6 recevra oralement 1ml d'une solution contenant une dose connue de coccidies spécifiques du poulet. Cette inoculation va entraîner des signes cliniques tels que la frilosité et la diarrhée qui doivent durer 3-4 jours avec guérison spontanée. Les animaux du lot 1 recevront 1 ml de la solution servant à diluer les coccidies (placebo).

En élevage, la coccidiose ne génère pas de mortalité puisque les poulets sont soit vaccinés, soit alimentés avec un aliment contenant un additif anticoccidien. Dans de très rares cas, si la maladie se déclenche de façon très virulente, il peut être observé un taux de mortalité de 1% au maximum. Dans le cas de cette étude la composition de l'inoculât est étudiée pour entraîner uniquement des signes cliniques de la maladie.

Les critères sanitaires et de bien-être des poulets (morbidité = nombre d'animaux présentant les signes cliniques de la maladie, mortalité, qualité de la litière) ainsi que les paramètres zootechniques (croissance, consommation d'aliment) seront suivis pendant toute l'expérimentation. Les lésions intestinales seront déterminées au bout de 21 jours, après mise à mort des animaux (24 poulets/lot). Le reste des animaux seront mis à morts à l'abattoir au terme des 78 jours de l'essai (216 animaux/lot) pour être commercialisés.

Remplacement : étant donné l'objectif du projet, l'espèce aviaire ne peut être substituée par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*. L'utilisation d'animaux expérimentaux est nécessaire, puisque cette étude ne pourrait pas être effectuée sur le terrain dans un élevage classique. Pour que les données soient valides, et permettent des comparaisons, il est nécessaire d'avoir 6 répétitions par lot et nous ne disposons pas de producteurs équipés pour respecter un tel dispositif.

Réduction : Le projet a pour objectif d'évaluer les effets sur le bien-être, l'état sanitaire et les paramètres zootechniques de différentes stratégies de prévention anticoccidienne chez le poulet de chair soumis à une infestation coccidienne expérimentale. Des expériences précédentes ont montré que pour mettre en évidence des effets significatifs, 6 répétitions de 240 poulets/lot sont nécessaires pour la zootechnie (poids, consommation alimentaire) et 24 poulets/ par lot pour les lésions digestives.

Raffinement : les poulets seront élevés au sol sur une litière de copeaux de bois à une densité de 6 poulets/m² soit une densité inférieure à celle pratiquée sur le terrain en poulet Label. Chaque groupe de 40 poulets aura accès à l'aliment et à l'eau à volonté ainsi qu'à un parcours extérieur dès 42 jours. Ils seront visités deux fois par jour afin de détecter précocement tout problème. Toute manifestation de symptômes comportementaux persistants définis par un point limite (animal prostré plus de 24 heures, couché au sol, ayant cessé de s'alimenter et/ou de s'abreuver et/ou qui ne répond à des stimulus visuels et tactiles) entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation. La méthode d'inoculation et la dose d'inoculât ont été définies avec un expert d'une agence gouvernementale, ce qui garantit la validité de ce protocole d'inoculation. Les animaux seront abattus à 78 jours d'âge dans les mêmes conditions qu'un lot de poulets Label élevé classiquement et puis commercialisés puisque les additifs utilisés sont autorisés en alimentation animale.

16513 Les microvésicules (MVs) constituent une population hétérogène de petites vésicules extracellulaires résultant du bourgeonnement de la membrane cellulaire en réponse à une activation ou à la mort cellulaire. Longtemps considérées comme de simples débris cellulaires dépourvus de fonction, elles sont désormais reconnues comme de véritables entités subcellulaires dotées d'activités biologiques, parmi lesquelles leur activité procoagulante, plutôt délétère qui participe à la formation du thrombus. Cependant, des travaux préliminaires réalisés dans le choc septique au sein de notre équipe ont permis de montrer que les MVs d'origine leucocytaire (MVLs) sont douées d'une activité fibrinolytique (CGP) protectrice, qui permettrait au contraire de lyser un thrombus. Cette activité est dépendante d'une enzyme : l'urokinase (uPA), qui a un rôle majeur dans l'activation de la plasmine et qui confère ainsi

aux MVs une capacité de lyse du thrombus *in vitro*. Les MVs sont donc capables de porter à la fois des molécules procoagulantes et fibrinolytiques supportant des activités à finalité opposée sur l'hémostase. La résultante appelée "balance coagulolytique" (BCL) dépend d'un équilibre entre ces deux activités et peut varier en fonction de l'origine cellulaire des MVs et du stimulus qui aura provoqué leur formation. Le choc septique est un syndrome clinique grave qui s'accompagne d'un déséquilibre de l'hémostase en faveur d'un état procoagulant. Des données préliminaires ont permis de montrer que la CGP dépendante des MVs est plus élevée chez les patients en choc septique et qu'elle est significativement augmentée chez les patients survivants comparés aux patients décédés. *In vitro* ces MVs circulantes de patients en choc septique sont capables de lyser de manière active un thrombus. Au cours d'un travail récent, nous avons aussi montré *in vivo* que l'injection de MVs profibrinolytiques, c'est-à-dire saturées en uPA, dans un modèle murin de choc septique améliorerait de manière très significative la survie des animaux en déplaçant la BCL des MVs circulantes vers un versant plus fibrinolytique, en réduisant le nombre de microthrombi intravasculaires. Il est déjà reconnu dans la littérature que l'activité fibrinolytique vectorisée par les MVs est partiellement protégée de ses inhibiteurs physiologiques. Cependant à l'heure actuelle aucune étude n'a encore montré l'intérêt de l'activité fibrinolytique portée par la fraction vésiculaire comparé à une fraction soluble. L'objectif de ce projet est donc de comparer la relevance clinique de l'activité de lyse portée par les MVs par rapport à une injection en quantité équivalente d'uPA soluble dans un modèle murin de choc septique. A partir du monitoring, de la surveillance étroite et de l'histologie des animaux, nous souhaitons évaluer l'impact de l'injection de l'activité fibrinolytiques portée par les MVs comparé à de l'uPA soluble sur l'évolution et la survie des animaux dans le choc septique. Ce projet vise à poursuivre l'exploration du potentiel protecteur des MVs circulantes dans le choc septique afin de proposer une prise en charge thérapeutique personnalisée et ciblée à chaque patient en fonction de l'activité coagulolytique des MVs circulantes. L'ensemble de la procédure envisagée nécessitera au maximum un total de 140 souris sur 1 an. Ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable (3R : Réduction). Au cours de nos expériences la souffrance sera évaluée grâce à une grille d'évaluation de la douleur et sera prévenue par l'utilisation répétée d'antalgique. Les animaux seront hébergés dans des cages (5/cage) avec enrichissements à types de copeaux, nids, avec alimentation et eau ad libitum (3R : Raffinement). Le recours à l'expérimentation animale se justifie par l'impossibilité réglementaire de conduire ce type de recherche chez l'homme sain, et le choix de l'espèce par le besoin d'un modèle animal déjà documenté en l'absence d'alternative possible (3R : Remplacement). La surveillance de l'absence d'atteinte de point limite sera réalisée également. Si nous observons un comportement de souffrance suite aux interventions (et sur la base d'une grille d'évaluation de la souffrance), un antalgique sera administré. Pendant la chirurgie, l'animal est anesthésié et la respiration sera suivie. L'animal est réchauffé par une table ou couverture chauffante ce qui permet de maintenir sa température interne et de lutter contre l'hypothermie due à l'anesthésie. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (augmentation de la fréquence respiratoire visible au niveau des flancs), si l'animal est prostré ou en retrait, ou s'il présente une perte de poids trop importante par rapport au poids de départ.

16514 Les syndromes neurologiques paranéoplasiques (SNP) (Paraneoplastic Neurological Degeneration : PND) sont des manifestations neurologiques qui se développent chez les patients atteints d'un cancer (cancer du poumon à petites cellules, cancer des ovaires...) chez lesquels une réponse immunitaire anti-tumorale va se diriger contre les neurones, provoquant une maladie auto-immune.

Selon la partie du cerveau qui est affecté les patients peuvent souffrir de symptômes neurologiques sévères ; problème de coordination motrice, de perturbations sensorielles, de déficiences cognitives, des problèmes de vision, perturbations du sommeil, crises... Bien que les mécanismes immunitaires pathogènes ne sont pas encore identifiés dans les SNP, la contribution des anticorps a longtemps été suggérée mais toujours non prouvée. Toutefois, le rôle potentiel des cellules T est de plus en plus mis en évidence, en particulier des cellules T CD8, dans le déclenchement des SNP.

Pour obtenir de nouvelles informations sur les mécanismes immunitaires impliqués dans les SNP, nous allons utiliser un modèle de souris génétiquement modifié, dans lequel l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe est exprimée dans les neurones. Des tumeurs exprimant HA seront injectées aux souris

ainsi que des lymphocytes T spécifiques à HA afin de mimer les syndromes observés en pathologie humaine.

Avec ce nouveau modèle, notre projet vise à élucider le lien entre l'efficacité des réponses cellulaires anti-tumorales T CD8 et l'inflammation du cerveau et des dommages causés.

En utilisant ces modèles murins, nous visons à répondre à des questions relatives à la pathogenèse neurologique paranéoplasique et aux soins médicaux y associés, et ce en déterminant :

1) Le rôle des lymphocytes T CD4 + et CD8 + spécifiques de l'antigène et des lymphocytes T CD4 régulateurs dans l'équilibre entre l'immunité anti-tumorale et l'auto-immunité du SNC. Ces résultats seront confrontés à des résultats chez l'homme.

2) Les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'atteinte à médiation immunitaire des neurones du SNC dans le but d'identifier des biomarqueurs de la maladie liée aux voies impliquées dans la pathogénicité, évalués par immunohistochimie, par la transcriptomique des cellules T infiltrant le SNC et par la manipulation pharmacologique ou génétique de la réponse cellulaire.

3) Analyse des cellules immunitaires innées du système nerveux central (microglie, cellules myéloïdes infiltrantes) par des approches globales et monocellulaires.

Cette étude permettra d'accroître nos connaissances sur la façon dont l'immunité tumorale peut être déclenchée avec succès; comment elle peut générer une maladie neurologique auto-immune rare mais très grave associée à un cancer, et aider à développer des stratégies thérapeutiques contre cette maladie invalidante.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 1230 animaux sur 3 ans. La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet :

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 gènes 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.

Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Ce projet a déjà obtenu l'accord du comité d'éthique régional et les études effectuées nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant de réduire le nombre d'animaux. De plus, nous avons également pu valider certaines approches expérimentales *in vitro* permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables.

Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, qui auront été définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

16515 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 permettre 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 joue un rôle essentiel dans le remodelage de la chromatine (l'ADN et les protéines qui y sont associées), un processus clé dans la régulation de l'expression des gènes. Le rôle de NIPBL au niveau des cellules cardiaques 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 et du remodelage chromatine lors

de la cardiogénèse. 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 le cœur, ce gène sera génétiquement inactivé dans les cellules cardiaques à l'aide du système Cre-Lox chez la souris adulte. Ces souris seront soumises à une analyse échocardiographique (système échographe petits animaux Vevo) afin de déterminer l'impact de la délétion de NIPBL sur la fonction cardiaque.

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 morphogénèse 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. 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. 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. 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.

Pour réaliser ce projet nous allons avoir besoin d'un total de 150 souris.

16516 Le cancer du testicule (CT) est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme jeune (15-35 ans). Il intervient au cours des années propices à la paternité. C'est ainsi un vrai problème de santé publique, d'autant que son incidence n'a cessé d'augmenter dans les pays industrialisés depuis plusieurs décennies. Cette tendance reste à ce jour inexplicée. L'étiologie de ce cancer, probablement multi-factorielle, est peu connue, même si des facteurs génétiques et environnementaux sont suspectés. L'identification précise d'acteurs impliqués dans la prédisposition et la survenue de ce type de cancer permettrait une meilleure compréhension des mécanismes impliqués. Ceci est d'autant plus important que, 5 à 10% des malades décèdent des suites de leur cancer. Ainsi, l'étude de la physiologie des cellules germinales (CG) est fondamentale, puisqu'elles sont à l'origine de la majorité (95%) des tumeurs testiculaires.

Des études récentes ont démontré les rôles des signalisations des acides biliaires via le récepteur nucléaire FXR α et le récepteur membranaire TGR5 dans la physiologie testiculaire et plus particulièrement des cellules germinales. Aussi, l'objectif de ce projet est d'analyser l'implication de ces signalisations cellulaires dans la survenue et/ou la progression des cancers germino-testiculaires.

Pour cela, nous souhaitons générer des lignées mutantes combinant l'inactivation de FXR ou TGR5 avec celle de Pten spécifiquement dans la lignée germinale.

L'objectif de cette procédure comprend la genèse et l'entretien des modèles de tumorigénèse spécifiquement au niveau testiculaire.

La genèse des deux lignées nécessitera plusieurs croisements intermédiaires qui devraient générer environ 150 souris par lignée (total de 300 souris). Puis, pour l'entretien des colonies des deux différentes lignées de ce projet, nous utiliserons environ 150 souris par an et par lignée afin de réaliser les expérimentations sur ces modèles. Donc au total nous devrions utiliser environ 2200 souris sur 5 ans pour l'ensemble de ces 2 lignées.

Dans le cadre de ce projet, les animaux d'intérêt seront mis à mort pour prélèvements des organes afin d'analyser le processus de tumorigénèse testiculaire. Les mères seront mises à mort à 3 mois après sevrage des petits.

Les souris d'intérêt seront mises à mort à 10 jours, 1 mois, 2 mois pour définir l'initiation et la progression des tumeurs.

L'ensemble de ce projet s'intègre au mieux dans le respect de la règle des 3R. Le remplacement par des approches alternatives n'est pas possible car aucune approche ne permettrait pleinement d'analyser les mécanismes complexes de l'étiologie et de la progression des tumeurs.

Cependant, dans une logique de réduction du nombre d'animaux, nous avons calculé au plus juste le nombre d'animaux utilisés, de façon à obtenir des données statistiquement valides.

Le raffinement reposera sur un hébergement et une surveillance des animaux ainsi que l'élaboration de protocoles prenant en compte au maximum le bien être animal. Ce reposera notamment avec un enrichissement des cages (tunnel en carton et maisons à souris). Les souris seront hébergées en groupes sociaux avec des tailles de cages conformes à la législation en fonction du nombre de souris.

16517 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 neurocognitifs et immunitaires qui persistent à l'âge adulte. De nombreuses études suggèrent que les macronutriments critiques dans cette période de la vie des enfants sont les protéines. Ainsi, chez le rongeur, une alimentation appauvrie en protéines induit notamment un retard de croissance.

Des études récentes suggèrent un lien fort entre la composition du microbiote intestinal (anciennement appelé flore intestinale) et le 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'épithélium intestinal est notamment composé de cellules entéroendocrines, elles représentent 1% de l'épithélium intestinal et sont impliquées dans la perception du contenu de l'intestin. Elles constituent le plus gros organe endocrine du corps et elles sont fondamentales au maintien de l'homéostasie métabolique (processus de régulation permettant le maintien des différentes constantes du milieu intérieur entre les limites des valeurs normales). En réponse à des signaux mécaniques ou chimiques, tels que des métabolites ou des molécules de surface provenant du microbiote, elles libèrent différentes hormones. Ces médiateurs peuvent agir sur l'ensemble de l'organisme, mais aussi localement en affectant les neurones localisés dans l'intestin appelés neurones entériques ou les cellules de l'épithélium intestinal. Les cellules entéroendocrines régulent ainsi la motilité intestinale, l'absorption des nutriments ou encore l'effet barrière de l'épithélium intestinal.

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet d'un probiotique (c'est-à-dire un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels) sur la mise en place et les fonctions physiologiques des cellules entéroendocrines dans un contexte de malnutrition protéique chez la souris juvénile.

Dans un premier temps, il s'agira de nourrir des souris après le sevrage avec un régime appauvri en protéines afin de mettre les souris dans un contexte de malnutrition pour comprendre l'effet de la malnutrition sur le développement et le fonctionnement des cellules entéroendocrines. Dans un second temps, après des apports oraux du probiotique pour lesquels l'hypothèse est qu'une intervention probiotique permettra de restaurer partiellement les déficits observés dans ce contexte de malnutrition, le développement et le fonctionnement des cellules entéroendocrines sera également étudié.

Pour ce projet, le respect de la règle des « 3R » sera appliqué :

Remplacement : Aucun modèle *in vitro* ne permet de reproduire la complexité d'un organisme dans son entier dans un contexte de malnutrition et pour l'étude des cellules entéroendocrines de l'intestin entier. C'est pourquoi cette étude nécessite l'expérimentation animale. La souris sera utilisée car il s'agit d'un bon modèle pour étudier les modifications induites par une malnutrition protéique sur les cellules entéroendocrines dans un contexte physiologique, ainsi que les conséquences locales et systémiques de ces modifications.

Réduction : Le nombre de souris nécessaire a été réduit à son maximum afin que la taille de l'échantillon permette de dégager des résultats statistiquement fiables, c'est pourquoi ce projet nécessitera 80 souris.

Raffinement : Les conditions d'hébergement, de soins, et les manipulations seront réalisés par du personnel qualifié assurant le bien être des animaux. L'usage du régime appauvri en protéines a déjà été testé et n'induit pas de comportement agressif chez les juvéniles.

Des points limites seront définis pour être assez prédictifs pour palier à toute souffrance, à tout mal être ou au stress animal, les expérimentations ne seront pas poursuivies au-delà de l'apparition de ces points limites

16518 Chaque nouveau traitement thérapeutique arrivant sur le marché a démontré, au préalable, son efficacité clinique.

Afin de pouvoir entrer en essai clinique, ces nouveaux traitements doivent avoir démontré, lors d'essais précliniques, qu'ils reposent sur un rationnel scientifique solide et des preuves de concept d'efficacité *in vitro* mais aussi *in vivo*.

Pour ce faire, les entreprises du médicament utilisent des modèles précliniques de cancers pertinents, permettant d'obtenir des données consolidées.

L'objectif de ce projet est de déterminer *in vivo* les propriétés antitumorales de traitements innovants (petite molécule et/ou biothérapie) afin d'identifier rapidement ceux ayant un potentiel d'efficacité fort en clinique et ne concentrer les études ultérieures sur ces seuls traitements d'intérêt. L'étude de ces traitements innovants permettra également de définir les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines xéno greffées sur souris ou PDX (pour Patient Derived tumor Xenografts). Ces modèles développés au cours des dernières années sont les seuls actuellement qui permettent de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine.

Ils permettent ainsi de valider le potentiel thérapeutique de ces traitements dans des modèles 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 traitements.

Ces études *in vivo* constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un médicament, réduite au strict nécessaire grâce aux données obtenues préalablement *in vitro*, mais ce travail sur organisme entier ne peut être Remplacé.

Les études d'efficacité *in vitro* effectuées préalablement permettent de sélectionner les traitements ayant un potentiel antitumoral intéressant. Ces étapes ont pour but de réduire globalement le nombre de thérapies à tester *in vivo* sans pour autant pouvoir remplacer totalement les essais sur animaux.

Les modèles utilisés sont parfaitement maîtrisés, notamment le taux de prise de greffe, ceci permet de raffiner les projets en l'utilisant que le nombre d'animaux strictement nécessaire.

Le raffinement passe également par une standardisation de l'hébergement des animaux de l'enrichissement de leur milieu et par l'application de points limites stricts.

Le projet dont la durée sera de 5 années sera constitué de 10 études visant à évaluer différents traitements thérapeutiques, chacun sur 30 modèles de PDX. Les études comprendront chacune 24 animaux au maximum, soit un total de 7200 animaux au maximum.

16519 L'hémophilie est une maladie hémorragique congénitale rare affectant principalement les hommes. Il en existe deux types : l'hémophilie A, la plus fréquente (1 naissance de garçons sur 5000 environ) et l'hémophilie B (1 naissance de garçons sur 30000 environ). Les gènes affectés sont ceux de deux facteurs de la cascade de la coagulation, le facteur VIII (FVIII) pour l'hémophilie A et le facteur IX (FIX) pour l'hémophilie B. Ces deux facteurs jouent un rôle crucial dans la formation du réseau de fibrine qui est le constituant principal dans la structure du caillot sanguin qui permet l'arrêt du saignement en cas de blessure vasculaire.

Le traitement standard de l'hémophilie repose principalement sur une thérapie de substitution : l'injection intraveineuse de FVIII ou FIX recombinants ou purifiés à partir de plasma. En raison de la

durée de vie réduite de ces facteurs après injection, les injections doivent être fréquentes (plusieurs fois/semaine), ce qui impacte la qualité de vie des patients. Il y a donc de nouveaux traitements qui ont été développés très récemment et qui visent à améliorer cet aspect. Ainsi des facteurs de coagulation à demi-vie allongée sont désormais sur le marché ainsi que des thérapies innovantes comme par exemple, l'utilisation d'un anticorps bi-spécifique qui mime l'action du FVIII et qui peut donc être utilisé dans l'hémophilie A.

Contrairement aux traitements standard (FVIII et FIX recombinants ou plasmatisés) qui sont bien connus, nous n'avons pas beaucoup de recul sur ces nouvelles thérapies et surtout sur leur capacité à normaliser la structure du caillot sanguin. Notre projet vise à établir comment ces nouveaux traitements affectent la formation spatio-temporelle du caillot sanguin par l'utilisation de techniques d'histologie et d'immuno-marquage pour visualiser la structure et la composition du thrombus.

Le système de la coagulation est complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs, autant des molécules procoagulantes que leurs inhibiteurs mais aussi des phospholipides membranaires. Pour obtenir des caillots sanguins représentatifs de la physiologie, nous devons nous assurer que l'intégralité des acteurs moléculaires et cellulaires seront présents ce qui exclut l'utilisation de modèles *in vitro*.

Nous prévoyons d'utiliser 120 souris pour ce projet. Des groupes de 3 souris sont prévus afin d'assurer une réponse reproductible.

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 seront effectuées par une personne habilitée à expérimenter sur animaux.

16520 Afin de lutter de plus en plus efficacement contre le cancer, il est nécessaire de faire avancer la recherche dans ce domaine. Le cancer demeure en effet un enjeu de santé publique majeur à l'échelle mondiale. Rien qu'en France, plus de 385.000 nouveaux cas ont été dénombrés en 2015.

Dans ce contexte, l'avènement des thérapies immuno-oncologiques est en passe de bouleverser la prise en charge des cancers. Ainsi, aux côtés de la chirurgie, de la radiothérapie, des chimiothérapies et des thérapies ciblées basées sur les inhibiteurs de kinases, l'immuno-oncologie est désormais la 5ème approche utilisée dans le traitement des cancers. Contrairement aux autres stratégies thérapeutiques, elle ne cible pas directement la tumeur, mais les cellules du système de défense de l'organisme. Elle a pour objet de réactiver le système immunitaire du patient afin qu'il élimine les cellules tumorales, comme il le fait en dehors d'un contexte pathologique pour toute cellule anormale.

Mais si l'efficacité de l'immuno-oncologie a largement été démontrée en clinique et offre des possibilités de traitement nouvelles pour certains cancers à un stade avancé, il reste un long chemin à parcourir pour trouver une solution thérapeutique pour tous ces cancers. Pour ces tumeurs de stade avancé, la prise en charge des patients est complexe et les possibilités thérapeutiques encore limitées, ce qui fait que le besoin médical en traitements innovants et efficaces est considérable. De ce fait, l'immuno-oncologie est devenue un axe de recherche majeur pour l'industrie pharmaceutique.

L'objectif de ce projet est donc l'évaluation sur des modèles murins pertinents de nouvelles thérapies immuno-oncologiques développées par des médecins et des chercheurs ainsi que par les industries du médicament.

La particularité de cette approche, ciblant les cellules du système immunitaire, nécessite des modèles précliniques spécifiques "immuno-compétents" - possédant des cellules immunitaires capables de détruire la tumeur après "réactivation" par ces thérapies innovantes.

Pour cela nous projetons d'utiliser deux types de modèles :

1-Utilisation de modèles de souris immunocompétentes, possédant un système immunitaire fonctionnel, sur lesquelles des tumeurs de souris sont greffées. Dans ce type de modèles, dits syngéniques, où la tumeur est tolérée par le système immunitaire, on peut évaluer l'impact d'un traitement donné sur le système immunitaire et la capacité de ce traitement à lever la tolérance immunitaire envers la tumeur. Les systèmes murins et humains étant suffisamment proche au niveau

immunologique pour permettre la translation des résultats précliniques aux résultats cliniques. Ainsi, la validation de cibles thérapeutiques chez la souris peut être transposée à l'homme.

2- Utilisation de modèles de souris humanisées, dans lesquelles un système immunitaire humain est implanté dans une souris porteuse d'une tumeur humaine. L'approche que nous avons choisie est d'injecter des cellules sanguines issues de donneurs sains (PBMC) à des souris très immuno déprimées (absence totale de système immunitaire) porteuses de tumeurs de patients (PDX).

Les greffes de tumeurs humaines xénogreffées sur souris, ou PDX (pour Patient Derived tumor Xenografts), permettent de conserver les caractéristiques de celles-ci à la fois d'un point de vue histologique et moléculaire. Ces modèles qui en l'état actuel de l'art sont ceux qui approchent au mieux la complexité des tumeurs humaines, sont sans doute les modèles qui s'approchent le plus de la maladie humaine, bien que l'environnement cellulaire qui entoure les greffons est constitué de cellules/tissus de souris. Et ces modèles sont aujourd'hui largement utilisés pour la validation préclinique de candidats médicaments de type chimiothérapies. Ces modèles associés à un système immunitaire humain sont aujourd'hui nécessaires à la validation de cibles préalablement identifiés dans les modèles syngéniques ainsi qu'à l'évaluation de stratégies combinatoires, comme les associations d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaires, celles d'un inhibiteur spécifique avec une chimiothérapie, ciblée ou non. Il faut également noter que certaines immuno thérapies ciblent des molécules qui ne sont pas présentes chez la souris, dans ce cas, seuls les modèles humanisés sont pertinents pour évaluer ces nouvelles approches.

Le projet comporte 4 phases et nécessitera l'utilisation de 2300 souris

1- Validation/caractérisation de 10 modèles syngéniques.

2- Evaluation de traitements dirigés contre de nouvelles cibles thérapeutiques (10 expériences, ou études).

3- Identification de modèles de PDX supportant la présence de cellules immunitaires (10 modèles testés)

4- Evaluation de traitements d'immuno thérapie dans des modèles de souris humanisées porteuses de PDX (10 expériences, ou études).

Dans le respect de la règle des 3 R,

1) L'utilisation de ces modèles *in vivo* permettant l'étude de l'interaction système immunitaire/tumeur ne peut être Remplacé

2) L'analyse des caractéristiques moléculaires des modèles (présence de la cible) permet de ne travailler que sur les modèles qui sont le plus susceptibles de répondre aux thérapies envisagées. De plus, les modèles utilisés sont parfaitement maîtrisés, notamment le taux de prise de greffe, ceci permet de réduire le nombre d'animaux en n'utilisant que le nombre d'animaux strictement nécessaire.

3) Les animaux seront hébergés en petits effectifs par cage et manipulés dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal. Les cages seront changées fréquemment. Dans chaque cage, les animaux recevront un enrichissement de milieu (Neslets) pour leur permettre de recréer un environnement proche de leur nid.

Lors de la greffe, afin de limiter la douleur, un mélange d'anesthésique et de tranquillisant sera administré aux animaux.

Ce même mélange sera administré avant tout prélèvement terminal.

Les animaux seront également anesthésiés (anesthésie gazeuse) pour les prélèvements sanguins au sinus rétro-orbital.

L'état physique et le comportement des animaux seront contrôlés quotidiennements.

Dans le cas des souris immunodéficientes injectées avec des PBMC, une attention particulière sera portée aux animaux du fait du développement subséquent d'une GVHD (réaction du greffon contre l'hôte) qui se manifeste quelques semaines après l'injection. Les animaux seront donc sacrifiés dès l'apparition d'un des symptômes suivants : perte de poids supérieure à 15% (par rapport au jour de l'injection), dos voûté, mobilité réduite.

16521 La consommation excessive d'alcool est l'une des causes majeures de décès au niveau mondial (~2.5 millions de morts/an soit 4% de décès dans le monde selon le Global Status Report on Alcohol 2011). L'arrêt de la consommation chronique d'alcool est souvent associé à de nombreux symptômes comme une anxiété accrue, des difficultés de concentrations et des déficits cognitifs. Dans ~70% des cas, le sevrage à l'alcool conduit à l'apparition de symptômes dépressifs dans la phase aigüe du sevrage. Le sevrage alcoolique induit également des perturbations à long-terme des fonctions cognitives induisant des troubles de l'attention et des déficits de mémoire (notamment la mémoire de travail) . Ces déficits de mémoire sont étroitement liés à l'apparition de modifications épigénétiques, c'est à dire à une perturbation de la conformation de la chromatine, et à des troubles endocriniens (axe corticotrope) dans le cerveau. Un des récepteurs cibles de l'alcool est le récepteur aux benzodiazépines qui, en interagissant avec les neurones via les récepteurs au GABA (acide Gamma Amino Butyrique), provoque des effets anxiolytiques, sédatifs, de détente musculaire, et aussi de modification du comportement. Lors du sevrage alcoolique, les neurones se retrouvent soudain privés des effets "inhibiteurs" induits par l'alcool, ce qui se peut se traduire par les signes de sevrage décrits ci-dessus, De nombreuses études ont montré l'impact positif de traitements médicamenteux ciblant les récepteurs aux benzodiazépines ou au GABA pour bloquer les effets du sevrage. Toutefois, les données actuelles portent uniquement sur des durées courtes de sevrage, ce qui ne permet pas de déterminer l'efficacité de ces traitements pour réduire les atteintes cérébrales et émotionnelles persistantes après un sevrage prolongé.

Ce projet de 2 ans, qui nécessitera un nombre total de 175 souris C57BL/6, a pour but de 1- caractériser les perturbations durables induites par le sevrage alcoolique au niveau comportemental, épigénétique et endocrinien et 2- de déterminer quels agents pharmacologiques sont les plus efficaces pour réverser ces perturbations. En application de la règle des 3R, il comportera deux étapes. Dans l'étude 1 (étude de screening), nous évaluerons sur un nombre réduit de groupes d'animaux quelles sont les modifications épigénétiques altérées durablement par le sevrage alcoolique et qui sont à l'origine de déficits de mémoire de travail. En fonction de ces résultats, l'étude 2 reposera sur un plus grand nombre d'animaux pour étudier quel traitement pharmacologique permet de réduire le plus efficacement les troubles cognitifs, anxieux et épigénétiques induits par le sevrage. Les souris seront soumises à une consommation d'alcool (12%v/v) pendant 6 mois, puis elles seront progressivement sevrées par palliers de 4% jusqu'à l'eau. Ce protocole a déjà été réalisé au laboratoire et a permis de montrer l'existence de troubles durables de l'activité endocrinienne et de la mémoire de travail, ainsi qu'une altération de la réactivité émotionnelle (accord CE 2013 N° 5012089-A). Pour cette raison, nous ne refaisons pas ces expériences, nous étudierons uniquement dans la phase de screening l'activité neuronale en lien avec la performance de mémoire, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

La souris représente une espèce de choix du point de vue neurobiologique et comportemental pour comprendre les effets délétères de l'alcool sur les capacités de mémorisation. En effet, l'organisation du système nerveux murin est relativement proche de celle de l'Homme, ce qui permet une extrapolation acceptable des résultats obtenus chez la souris à l'espèce humaine. Nous avons choisi la lignée de souris C57BL/6 car celle ci possède une appétence naturelle pour l'éthanol faisant d'elle un modèle de choix pour étudier les effets d'une prise chronique et modérée d'alcool et du sevrage alcoolique. Par ailleurs, à la suite de l'interruption d'une prise chronique d'alcool, cette lignée de souris présente des symptômes de sevrage (convulsions) extrêmement faibles, voire totalement absents dans notre protocole qui repose sur une procédure de sevrage progressif.

Cette étude ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. Les souris seront hébergées dans une pièce calme avec minimum de fréquentation par expérimentateurs ou techniciens animaliers de façon à réduire le stress ou l'inconfort. Les animaux seront surveillés quotidiennement et disposeront du matériel nécessaire pour construire un nid (papier sopalin ou Nestlets) pour l'enrichissement du milieu.

Les études comportementales et pharmacologiques nécessitent au minimum 10-12 animaux par groupe afin de garantir la solidité et une bonne interprétation des données. Aucune des procédures décrites dans ce projet ne provoquent ni douleur ni détresse.

Afin de limiter au maximum le stress des animaux, une habituation à l'expérimentateur par manipulation quotidienne légère est réalisée. Un seul manipulateur manipule les animaux pendant toute la durée de

l'expérience. Aucun des tests comportementaux n'est invasif, douloureux ou ne nécessite de privation alimentaire ou hydrique; les animaux seront habitués à la pièce comportementale et au dispositif. Tout ceci ayant pour objectif de diminuer le stress des animaux et d'améliorer la fiabilité des tests comportementaux.

16522 Les principes de la perception sensorielle demeurent aujourd'hui une importante question expérimentale et théorique. Une des difficultés majeures est que la perception émerge dans des systèmes d'aires sensorielles connectées les unes aux autres de manière complexe et dont l'activité est connue de manière très parcellaire par des enregistrements de petits nombres de neurones chez un animal. En conséquence les modèles actuels du traitement sensoriel sont incomplets et échouent à expliquer beaucoup de structures perceptuelles fondamentales établies sans effort par le cerveau comme les formes de base constituant les objets (lignes, courbes, textures) et les signatures des sons communs (timbre d'un instrument de musique, signature du genre dans une voix, sons provenant d'un choc etc...).

Nous proposons, dans ce projet, d'établir une nouvelle approche d'étude des systèmes sensoriels qui combine de nouveaux outils mathématiques de traitement des données, inspirés du fonctionnement du cerveau, les réseaux profonds, avec des méthodes d'enregistrement optique à très haut-débit (>1000 neurones simultanément) permettant pour la première fois un échantillonnage extensif de zones cérébrales entières avec une résolution à l'échelle de la cellule. Nous appliquerons cette approche au système auditif de la souris en premier lieu, mais aussi à d'autres structures associées au traitement sensoriel en général. Ceci permettra d'obtenir un ensemble de données 100 à 1000 fois plus important que les ensembles existant, sur la base duquel il sera possible de construire un modèle détaillé des opérations de traitement de l'information du système.

Par ailleurs les données larges échelles extraites de cette campagne de mesure systématique seront mises à disposition de la communauté scientifique une fois analysés (mise en ligne via un serveur de données), afin de réduire l'utilisation d'animaux pour évaluer et surtout modéliser les représentations sensorielles de la souris.

Le projet repose sur trois procédures expérimentales de sévérité modérée, appliquées à 620 souris. La première procédure permet l'enregistrement massif de neurones par imagerie pendant la perception. La seconde procédure permet des enregistrements complémentaires par électrophysiologie pour valider les conclusions de l'imagerie où accéder à des zones inaccessibles par imagerie. La troisième procédure permet de réaliser ces enregistrements pendant des inactivations ciblées et réversibles de zones cérébrales, afin d'établir le rôle de ces zones dans le codage sensoriel. Ces procédures impliquent la pose chirurgicale d'un implant pour l'imagerie optique et, après une période de récupération de deux semaines au minimum, une brève anesthésie et une contention de l'animal à l'état vigile sur un maximum de 3 heures pendant les séances d'imagerie. L'approche expérimentale utilisée respecte les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement comme détaillé ci-après.

Remplacement : Les calculs implémentés par circuits neuronaux permettant de générer la perception sensorielle sont encore mal compris. Il existe des algorithmes permettant d'approcher ces fonctions (par exemple reconnaissance vocales), mais ils souffrent de nombreuses imperfections, et ne sont pas directement inspirés des circuits biologiques. Il reste donc essentiel d'utiliser des modèles animaux pour observer ces circuits pendant la perception avec une précision et une échelle suffisante pour décoder leur fonctionnement.

Bien que la compréhension des mécanismes sous-tendant la perception de sons complexes est souvent étudiée chez des mammifères 'supérieurs' (marmouset, furet), il a été montré récemment qu'un grand nombre d'aspects de la perception des sons complexes sont présents chez la souris, ce qui permet de réaliser cette étude chez un modèle animal plus simple. Par ailleurs, l'exploration extensive du système auditif entier est rendue possible par de nouveaux outils de microscopie et de génétique disponibles uniquement chez la souris, qui, dans le cas présent, ne peut être remplacée par aucun autre modèle.

Réduction : Grâce à l'utilisation de méthodes d'imagerie optiques modernes permettant d'enregistrer plus de 1000 neurones en parallèle, combinées à des algorithmes de traitements de grands ensembles

de données nous obtiendrons une caractérisation extensive du système auditif et de ses interactions avec d'autres systèmes en utilisant un minimum d'animaux. Ainsi, pour cette expérience couvrant 12 structures cérébrales avec un total estimé de plusieurs millions de neurones enregistrés, seulement 620 souris seront utilisées sur 5 ans, en incluant les nécessaires essais préliminaires pour la calibration de l'imagerie. Le nombre d'animaux utilisés est aussi minimisé par la possibilité de répéter le protocole de mesure sur plusieurs jours voire plusieurs semaines avec le même animal pour maximiser la taille de l'échantillon de neurones collecté sur chaque animal, et ainsi atteindre des échantillons de plusieurs centaines de milliers de neurones, permettant une précision statistique jamais atteinte

Raffinement : Les trois procédures expérimentales de ce projet impliquent une analgésie et des temps de repos appropriés pour minimiser la souffrance, un suivi quotidien des animaux, et la définition de points limites précis basés sur des indicateurs de poids, d'aspect général et de comportement, entraînant l'arrêt de l'expérience ou la mise à mort s'il n'est pas possible de pallier immédiatement la souffrance de l'animal. La sévérité de ces 3 procédures est de ce fait considérée comme modérée.

16523 La quantité de plaquettes dans le sang est le résultat de la production des plaquettes et de leur élimination. Un nombre insuffisant de plaquettes, ou la présence de plaquettes non fonctionnelles peut-être responsable de saignements et représente un risque hémorragique. Etudier les événements qui contrôlent la production et l'activation des plaquettes est essentiel afin de développer de nouvelles voies thérapeutiques contre les saignements. Les plaquettes sont produites dans la moelle osseuse à partir de cellules appelées les mégacaryocytes (MK). Nous avons identifié une nouvelle protéine, appelée MICAL1, qui n'a jamais été décrite dans le MK et la plaquette. Cette protéine est responsable de l'équilibre délicat existant pour une protéine appelée actine, entre une forme dite polymérisée et une forme dépolymérisée. Cet équilibre est essentiel pour produire et activer les plaquettes. Des premiers tests *in vitro* dans une lignée cellulaire, nous ont montré que MICAL1 était nécessaire à la formation des plaquettes. Cependant comprendre comment les plaquettes sont produites et activées par MICAL1 dans un environnement physiologique, dans la moelle osseuse et dans la circulation sanguine, requière des études *in vivo*. En effet, l'étude de la production à partir de la moelle osseuse mais également les modèles d'activation plaquettaire et de thrombose (mécanismes qui bouchent les vaisseaux) et de temps de saignement ne peuvent pas être fait chez l'homme ou au moyen d'une lignée cellulaire. En revanche, un modèle de souris dont le gène codant pour MICAL1 a été supprimé permettant d'étudier l'ensemble de ces processus.

Le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) a été une préoccupation constante dans la préparation du protocole de notre étude et toutes les procédures ont été conçues pour les respecter. Le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques limitera la souffrance. L'ensemble des expériences sera réalisé par une personne habilitée à l'expérimentation sur animaux. L'objectif est de limiter le nombre d'animaux nécessaire. Pour cela, nous pourrions réduire le nombre d'animaux en utilisant les mêmes souris dans plusieurs procédures. Enfin, des tests statistiques ont été réalisés pour chaque expérience afin d'utiliser au minimum le nombre d'animaux. On estime que 251 souris représente le maximum des souris nécessaires pour l'ensemble des procédures. Ce nombre pourra être réduit en fonction des résultats obtenus dans les premières expériences, nous adapterons les procédures en tenant compte des points limites à ne pas dépasser, en particulier une éventuelle perte de poids de l'animal ou un comportement indicateur d'une souffrance quelconque. Les procédures se feront dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectant au maximum le bien-être des animaux avec un milieu enrichi (morceaux de bois à ronger et filaments de papier kraft pour faire un nid) dans des cages à portoirs ventilés avec un nombre d'animaux respectant la surface nécessaire à la vie de l'animal (3-5 animaux/cage). Les souris recevront nourriture et boisson *ad libitum*.

16524 La racine de chicorée (*Cichorium intybus*) reste la principale source industrielle d'inuline et est également utilisée comme ingrédients alimentaires une fois transformée en farine ou en produits torréfiés. Elle rentre ainsi dans notre alimentation sous différentes formes entraînant une consommation implicite d'inuline. En outre, la racine contient d'autres composés majeurs notamment des acides chlorogéniques (encadrés dans les polyphénols) et des lactones sesquiterpéniques, susceptibles de présenter aussi des intérêts nutritionnels et pharmacologiques.

La consommation de chicorée en tant que matrice alimentaire a été souvent associée avec des effets bénéfiques pour la gestion de l'appétit, la réduction de la satiété et la perte de poids mais aucun mécanisme n'a été encore mis en évidence pour appuyer ces observations. Si certains des métabolites spécialisés identifiés dans la racine de chicorée sont connus pour leurs actions antivirale, anti-inflammatoire, analgésique, ou encore anticancéreuse, les effets bénéfiques sur le microbiote intestinal ou sur l'expression des gènes et les mécanismes physiologiques dérivés n'ont pas été encore décryptés.

La chicorée industrielle demeure une culture emblématique de la Région Hauts-de-France qui est le 1er producteur européen de chicorée torréfiée. Plusieurs variétés de chicorée ont été déjà sélectionnées pour leurs qualités alimentaires. Valoriser les différents génotypes de chicorée, en tant qu'aliments fonctionnels, sources de produits ou d'ingrédients prébiotiques, représente un grand enjeu scientifique qui permettrait aussi de positionner la filière chicorée sur l'amélioration du statut santé du consommateur.

L'objectif de ce projet est de tester différents génotypes de chicorée sélectionnés et utilisés dans l'alimentation sous forme de farine, racines torréfiées, extraits de polyphénols et sesquiterpènes, et de déterminer si les variations dans la composition en inuline mais aussi en polyphénols et lactones sesquiterpéniques induisent des variations dans les paramètres biologiques et physiologiques. Des analyses des effets sur le microbiote intestinal (métagénomique) sont envisagées avec les différents produits issus de la chicorée, des dosages d'hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire (GLP-1, CCK, PYY) ainsi que des analyses transcriptomiques sur des microarrays ADN sont également prévues pour compléter le classement des variétés de chicorée en tant que aliments fonctionnels.

Sur 9 génotypes de chicorée sélectionnés pour leur composition métabolomique, seulement deux génotypes seront utilisés dans notre analyse. Ces deux génotypes présentent les contenus les plus contrastés en inuline et composés phénoliques et représenteront les indicateurs suffisants dans cette étape pour observer des réponses de l'organisme animal, et qui permettront ainsi une réduction du nombre d'animaux d'expérimentation. Nous avons un total de 10 conditions à tester (contrôle, 2 farines de chicorée, farine de blé, 2 extraits de polyphénols et sesquiterpènes avec 2 concentrations différentes et l'inuline avec 2 concentrations différentes), souris de deux sexes et trois points cinétiques de prélèvement (J0, J30 et J36). Nous allons étaler ces expérimentations sur 5 ans. Le nombre total d'animaux prévu pour notre projet sur 5 ans est de 360.

Le protocole que nous envisageons a été déjà accepté par le comité d'éthique pour un programme court d'expérimentation. Suite à ce premier plan expérimental nous avons pu obtenir des résultats probants qui nous permettent de mieux interroger les mécanismes physiologiques. Cette fois nous allons tester des produits en préparation alimentaire proche de l'alimentation humaine (ex. farine cuite, décoctions), une comparaison sera faite avec la farine de blé, deux types d'extraits à valeur pharmacologique (extraits de polyphénols et sesquiterpènes) ainsi qu'une solution d'inuline pure extraite de chicorée et nous allons utiliser des souris BALB/cOlaHsd des deux sexes. Au cours des expérimentations, les souris seront suivies plusieurs fois par jour afin d'évaluer leur bien-être et aucun signe de détresse considéré comme point limite ou souffrance sévère ne sera accepté (difficulté respiratoire, prostration, baisse de vivacité, etc.).

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.

16525 La migraine est un désordre neurovasculaire caractérisé par des crises récurrentes de céphalées accompagnées de troubles neurologiques variables dont l'allodynie cutanée céphalique (sensation douloureuse au toucher léger). Ce symptôme est le plus fréquent chez les patients atteints de migraine. Il affecte 60 à 80% des patients souffrant de migraine chronique. De plus, l'apparition de l'allodynie est considérée comme un facteur de risque de chronicisation de la migraine.

Les traitements antalgiques de la migraine restent encore de nos jours insatisfaisants. En effet, les traitements de crise à base de triptans ou même d'opioïdes ont une efficacité relativement limitée et peuvent provoquer des effets indésirables importants et un abus médicamenteux. D'autres cibles moléculaires peuvent cependant être envisagées avec en particulier les inhibiteurs d'enképhalines (IENk) qui bloquent la dégradation des opioïdes endogènes. Ces composés constituent un nouvel espoir dans le traitement de la migraine car, en plus d'être dénués des effets secondaires des opioïdes, des travaux préliminaires ont montré une activité antalgique dans un modèle de migraine par donneur de NO chez le rat. Ce modèle, utilisé dans ce projet, permet de mesurer une allodynie mécanique céphalique après injection systémique intrapéritonéale d'ISDN, un donneur de NO (monoxyde d'azote) connu chez l'homme pour déclencher des crises de migraine.

Le but de ce projet est de tester dans ce modèle l'association de deux composés : le sumatriptan (antimigraineux de référence) et un IENk afin de montrer si cette association peut induire une interaction positive, c'est-à-dire une analgésie supérieure à l'addition des effets des deux molécules prises individuellement (synergie).

Pour ce faire, chez le rat, plusieurs doses de sumatriptan et d'un IENk seront testées afin de déterminer la dose efficace 50% (ED50, dose qui permet d'obtenir 50 % de l'effet antalgique maximal) pour chacun d'eux. A partir de ces valeurs une étude isobolographique sera menée pour définir la nature de l'interaction entre les 2 composés. Ainsi une courbe dose réponse de l'association sera obtenue après administration des 3 associations suivantes : (ED50 IENk+ED50 sumatriptan) /2, (ED50 IENk+ED50 sumatriptan) /4, (ED50 IENk+ED50 sumatriptan) /8. A partir de là, l'ED50 de l'association sera calculée pour construire l'isobologramme et comparée aux ED50 individuelles. Cette comparaison permettra de déterminer si l'association des 2 composés conduit à un effet antalgique additif ou synergique.

Durant ce projet, nous mesurerons après chaque injection la sensibilité cutanée par l'application mécanique de filaments de von Frey permettant de détecter un seuil (en g) de retrait facial et donc une allodynie en cas de baisse de ce seuil. Ces mesures seront effectuées après injection ISDN (10mg/kg) toutes les 30 minutes pendant 4h chez le rat vigile. Chaque injection d'ISDN sera précédée 10 minutes avant par une administration orale de IENk, de sumatriptan ou de serum physiologique.

Dans ce projet, l'effet antiallodynique des composés étudiés nécessitera, dans un premier temps, de 3 groupes d'animaux pour 3 doses de sumatriptan (afin de calculer l'ED50) ; 1 groupe pour une dose d'IENk sachant que nous disposons déjà des effets antalgiques pour 2 doses. Dans un deuxième temps, 4 autres groupes d'animaux seront nécessaires dont 3 correspondant aux 3 ED50 associations (cités précédemment) et 1 groupe témoin négatif (serum physiologique) correspondant.

Tous les animaux seront mis à mort par overdose d'anesthésique à la fin de la procédure (4h post - injection ISDN)

Nos résultats permettront de montrer si l'association de IENk et sumatriptan (à des doses faibles) est aussi efficace dans le traitement de l'allodynie que les composés seuls (à doses plus élevées) et offrant ainsi un élément de plus dans l'arsenal thérapeutique anti-migraineux qui, de plus, réduirait ainsi les risques d'effet secondaires comme l'abus médicamenteux (lui même associé à l'aggravation de la migraine).

Afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats (80 au total) pour 8 groupes de 10 animaux tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si la distribution est normale ou un test non paramétrique dans le cas contraire). Le recours à l'animal vivant pour le projet est justifié par le fait que l'étude des effets antalgiques de l'agent pharmacologique ne peut être réalisé que sur un animal conscient. Sachant que cette étude, du fait même de sa nature (étude douleur), ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions d'injections et de mesure, toute observation de signes (points limites) tels que la prostration, l'impossibilité de manipulation, à se mouvoir, mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection létale d'anesthésique.

16526 Le Plan Départemental pour la Protection du milieu aquatique et la Gestion des ressources Piscicoles (PDPG) définit pour 5 ans la gestion piscicole à pratiquer sur les cours d'eau du département en fonction des conditions du milieu et de la fonctionnalité des populations en place. Très succinctement : les cours d'eau abritants des populations fonctionnelles et/ou de souche autochtone sont en gestion patrimoniale (i.e. pas de déversement) ; les cours d'eau très dégradés sont en gestion halieutique (i.e. déversement de poissons adultes pour satisfaire le loisir pêche) ; les cours d'eau intermédiaires où l'on peut espérer soutenir les populations naturelles ou réimplanter des populations sont en gestion de restauration (i.e. déversement d'alevins).

Ces alevins sont produits et élevés en pisciculture par les Associations Agréées pour la Pêche et la Protection des Milieux Aquatiques (AAPPMA) avant d'être déversés dans les cours d'eau et plans d'eau du département au printemps et début d'été ("plan de restauration"). Le projet présenté ici a plusieurs objectifs : (1) Eviter la consanguinité dans les alevins produits en différenciant les fratries dans les stocks de géniteurs (truite et omble), (2) suivre l'évolution de la variabilité génétique à l'intérieur des stocks par l'analyse de deux marqueurs microsatellites (truite uniquement) et (3) constituer des stocks de souche autochtone pour la truite fario (i.e. souche méditerranéenne).

Pour satisfaire l'objectif (1) « différencier les fratries », plusieurs méthodes d'identification ont été étudiées puisqu'il n'est pas possible d'élever un grand nombre de lots séparément. La méthode d'injection d'élastomère en sous cutané (Visible Implant Elastomer) a notamment été essayée mais celle-ci demande beaucoup d'expérience pour que la marque soit visible et pérenne. De plus la multiplication des couleurs et des sites d'injection pour différencier les 10 à 15 lots de chaque stock rendaient l'identification pénible et parfois incertaine. L'objectif (2) « évaluer l'appauvrissement génétique du stock » nous oblige de toute façon à connaître l'identité de chaque poisson afin de ne pas multiplier les analyses génétiques. Malgré la recherche de méthode alternative il apparaît que seul le marquage PIT tag puisse répondre à nos objectifs.

Les alevins qui vont servir à constituer les stocks de géniteur sont marqués au stade 1+ (i.e. « plus de 1 an ») à l'aide de marqueurs PIT-tag (Passive Integrated Transponder). Les PIT-tag sont des marques non alimentées par une batterie qui émettent une fréquence radio unique lorsqu'ils sont excités par un champ magnétique (lecteur portatif Oregon RFID). Cette méthode permet le marquage rapide d'un grand nombre d'individus (plusieurs centaines) pour un temps quasi illimité (très longue durée de vie de la marque). N'ayant pas besoin d'une grande distance de détection lors de cette opération, seules les tags de 12mm seront utilisés afin d'être le moins intrusif possible.

Pour la truite fario l'objectif est d'avoir 600 à 800 géniteurs 3+ (i.e. « plus de 3 ans ») afin de produire le nombre d'alevins nécessaires pour la réalisation des plans de repeuplement. En fonction des taux de survie observés dans chaque pisciculture (hors marquage), du taux de perte de tag (<2.5%) et de la mortalité due au marquage (<3%), nous marquerons au maximum 1500 truitelles de plus d'un an. Dans la majorité des cas l'effectif sera bien inférieur. Le nombre d'études de ce type durant les cinq prochaines années sera au maximum de quatre. Le nombre maximum de truite sera $1500 \times 4 = 6000$ individus sur cinq ans.

Pour l'omble chevalier l'objectif est d'avoir environ 800 à 1000 géniteurs 3+. Les pertes dues à l'élevage sont plus importantes pour cette espèce qui est encore plus exigeante que la truite vis à vis de la température de l'eau. En fonction des taux de survie observés lors de la constitution des stocks précédents dans la pisciculture concernée nous pourrions marquer jusqu'à 2000 ombles à l'âge de 1+. Le nombre d'études de ce type durant les cinq prochaines années sera au maximum de deux. Le nombre maximum d'ombles sera $2000 \times 2 = 4000$ individus sur cinq ans.

Le nombre maximum de poissons utilisés dans ce projet durant les cinq prochaines années sera donc de 10 000, toutes espèces confondues.

Après le marquage les poissons sont élevés en pisciculture de façon classique jusqu'au moment de leur première reproduction ; tous les poissons sont mélangés dans un ou plusieurs bassins. Au moment du prélèvement de gamètes les poissons seront « scannés » (lecteur portatif Oregon RFID) afin de connaître leur identité et ainsi choisir le ou les individus avec lesquels les gamètes vont être fécondés dans le but d'éviter les croisements entre poissons de la même fratrie, et ainsi de maximiser la diversité génétique. Lors de cette opération des poissons pourront perdre leur tag, notamment les femelles qui peuvent l'expulser en même temps que les œufs. Le cas échéant le tag sera réimplanté en intramusculaire de manière à éviter de répéter l'opération tous les ans.

Malgré nos recherches de méthodes de remplacement, l'identification d'un grand nombre d'individus nous oblige à utiliser des marques PIT-tag. La taille des échantillons a été adaptée en fonction des caractéristiques de chaque pisciculture (taux de survie hors marquage) afin d'avoir un nombre de géniteurs suffisants pour produire le nombre d'alevins préconisé dans les plans de gestion ("Réduction"). Dans ce projet le raffinement a surtout consisté à limiter le nombre d'opération par poisson (marquage en intra-musculaire en cas de perte de tag) et limiter au maximum le stress (protection visuelle des poissons, maintien dans les bassins d'élevage pendant presque toute l'opération) et la souffrance des poissons pendant le marquage (anesthésie générale).

16527 La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin touchant environ 1 million de personnes en Europe. Les principales manifestations de la maladie sont les douleurs abdominales, une diarrhée chronique et l'amaigrissement. La maladie évolue par périodes de crise entrecoupées de périodes de rémission. Les traitements actuels consistent à limiter l'inflammation, ce qui a pour effet de soulager la douleur, la diarrhée et les autres symptômes. Cependant, la maladie reste incurable et les patients en rémission font des rechutes inflammatoires (dans certains cas, les crises sont telles qu'une hospitalisation devient nécessaire). C'est pourquoi les recherches pour trouver de nouveaux traitements à la MC sont essentielles. Les travaux menés ces dernières années ont permis de montrer qu'un mauvais fonctionnement du processus autophagique semblait être un déterminant central de cette pathologie.

L'autophagie est un processus biologique nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire et au renouvellement des organites cellulaires. L'autophagie consiste à la formation à l'intérieur du cytoplasme d'une vésicule membranaire permettant de séquestrer les organelles non fonctionnelles, les protéines mal repliées ou des pathogènes afin de les dégrader. Or, un défaut d'autophagie est observé chez les patients souffrant de MC. Restaurer une autophagie fonctionnelle pourrait ainsi être une approche intéressante dans le traitement de la MC.

Des travaux menés par nos collaborateurs ont permis d'identifier une petite molécule chimique (un peptide) stimulant l'autophagie. Ce peptide non toxique est actuellement en cours de test clinique chez des patients atteints de Lupus Erythémateux Disséminé, une maladie où un défaut d'autophagie est également impliqué. Le but du présent protocole est de tester l'efficacité de ce peptide dans des modèles murins de colites induites mimant la MC. Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. En effet, aucune méthode alternative n'existe car nous désirons étudier la capacité du peptide à améliorer les symptômes (diminution de la réponse inflammatoire notamment). Sur la durée du protocole (5 ans), nous utiliserons un maximum de 224 souris. Les animaux seront hébergés dans des cages standards avec un accès illimité à l'eau et à la nourriture. De plus, le milieu sera enrichi à l'aide de maisons en plastique. Un suivi quotidien des animaux sera effectué de manière à repérer toute détresse animale. Le poids des souris sera également suivi avec attention (pesées tous les jours dès l'induction de la colite) car c'est un très bon marqueur de l'inflammation intestinale et de la sévérité

d'une diarrhée. Une perte de plus de 20% du poids avant induction de la colite constituera un critère d'arrêt et l'animal en question sera mis à mort.

A terme, cette étude pourrait permettre d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques pour lutter contre la maladie de Crohn.

16528 Le projet vise à obtenir des modèles de diabète de type 2 ainsi que des modèles de stéatose hépatique non alcoolique (NASH) afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules. Ces modèles sont obtenus par induction (à différents stades de développement pour les 2 premiers) :

- Alimentaire : régime spécifique
- Chimique : injection de streptozotocine
- Chirurgicale : ablation partielle du pancréas

L'ensemble de ces modèles vise à mimer les caractéristiques majeures du diabète de type 2 humain et de ses complications ainsi que la NASH. Le diabète de type 2 présente une anomalie de l'homéostasie glucidique, conséquence d'une résistance tissulaire à l'insuline, d'une diminution de la masse des cellules bêta du pancréas et d'un défaut de la réponse insulinaire au glucose. Parmi les complications du diabète, la prévalence de la NASH est estimée entre 22 et 70% de la population et cette complication est amplifiée par les problèmes d'obésité, de dyslipidémie et d'hypertension artérielle.

Aucun modèle unique ne mimant l'intégralité de la pathologie humaine, il est nécessaire pour caractériser l'activité de nouvelles molécules sélectionnées au préalable sur des tests *in vitro* de les évaluer *in vivo* pour leur activité dans différents modèles animaux (rats, souris, hamster) en fonction du mode d'action présumé de la molécule à tester. La totalité des animaux nécessaires sur la durée du projet (rats, souris, hamsters) est estimée à 14500. Les études sont effectuées selon la règle des 3R : nombre d'animaux minimum pour obtenir une significativité statistique satisfaisante, réutilisation des animaux selon les expériences (par exemple pour les tests de tolérance au glucose), utilisation des critères d'interruption, gestion de la douleur avec utilisation de protocoles expérimentaux adaptés.

16529 Lors du développement de médicaments vétérinaires, qu'il soit innovant ou que ce soit un médicament générique, un ensemble de tests de sécurité sont mis en oeuvre avant de démarrer des essais cliniques sur le terrain. Il est nécessaire de vérifier l'innocuité de chaque formulation dans l'espèce à laquelle elle est destinée.

Le présent projet concerne l'évaluation de la tolérance de formulations thérapeutiques destinées au Chien. On teste la tolérance en tout dernier lieu, lorsqu'on a la certitude que le médicament n'est pas toxique. Les tests évaluent ici les éventuels effets secondaires, à la dose thérapeutique, lors d'administrations répétées. Ce sont les derniers tests avant le passage aux essais cliniques sur des chiens sains puis des chiens malades.

Les formulations auront déjà été précisément évaluées via des méthodes de remplacement (culture cellulaire par exemple) et éventuellement des essais sur d'autres espèces (rongeurs et/ou lagomorphes). Pour des médicaments génériques, on se base aussi sur les éléments disponibles dans le dossier de mise sur le marché initial du médicament.

Chaque évaluation de tolérance se fera sur un nombre limité de chiens. Ce nombre peut être de 3 à 5 chiens, qui recevront le produit par la voie de destination : gélule, comprimé, solution buvable ou injectable, selon la fréquence prévue par le futur traitement.

Nous estimons que le projet nécessitera au maximum l'utilisation de 25 chiens, pour l'évaluation de 5 médicaments sur 5 ans.

Ce nombre d'animaux pourra être réduit si moins de produits sont testés ou si moins d'animaux sont utilisés pour un médicament. D'autre part, nous pouvons faire appel à des chiens qui ont déjà été utilisés pour d'autres projets. Ce projet ne nécessite pas l'euthanasie des chiens, ils peuvent donc être utilisés plusieurs fois dans ce projet, après un temps de repos, par mesure de réduction.

Ces évaluations de tolérance interviennent en fin de développement des médicaments, et l'utilisation d'animaux de laboratoire est indispensable pour une dernière validation des données d'innocuité

obtenues par les méthodes de remplacement, avant des essais cliniques (chez le Chien spontanément malade) A ce stade, nous attendons peu de signes cliniques, mais si des effets indésirables apparaissaient, le traitement serait arrêté et les animaux soignés.

Le principal bénéfice attendu est une administration sûre aux patients en clinique vétérinaire.

Durant toute les phases expérimentales, les chiens subiront un minimum de contraintes et de stress. Ils seront hébergés dans des conditions en adéquation avec les besoins de leur espèce: en groupe, avec des jouets, et la possibilité d'aller à l'extérieur.

Les personnes réalisant les procédures et s'occupant des animaux seront qualifiées pour ces tâches.

16530 Cette version V2 de la saisine dont la version V1 est déjà autorisée, correspond à l'amendement-1 modifiant le protocole d'induction des ampoules cutanées inflammatoires.

Les maladies inflammatoires aujourd'hui regroupées sous le terme d'IMID (immune mediated inflammatory disease) ont une incidence en constante augmentation notamment dans les pays industrialisés. Elles peuvent être systémiques comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et les vascularites ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, ou encore le psoriasis. Parmi ces maladies inflammatoires, certaines sont auto-inflammatoires et d'autres auto-immunes, elles ne mettent pas en jeu les mêmes cellules du système immunitaire mais dans tous les cas, cela conduit à une réponse inflammatoire exacerbée. Cette inflammation entraîne la formation de lésions, une réparation tissulaire inefficace voire la destruction de l'organe dans les formes les plus sévères.

Les traitements actuels essaient de limiter cette inflammation à l'aide de différentes molécules notamment chimiques donc non-spécifiques. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. De tels traitements ont fait l'objet d'essais cliniques dans différentes pathologies de l'inflammation comme les molécules inhibitrices du TNF-alpha (une des principales cytokines sécrétées par le système immunitaire innée et responsable de l'inflammation). Seulement, l'effet de ces molécules n'est pas spécifique à la pathologie mais à l'ensemble des réponses immunitaires et elles sont associées à de nombreux effets secondaires ainsi qu'à l'échec du traitement.

Les nouvelles stratégies d'immunothérapie cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires et pour cela les approches sont plus spécifiques de populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires spécifiques de l'organe pathologique. Parmi les populations du système immunitaire, il existe des populations suppressives de la réponse inflammatoire. Augmenter leur fonction suppressive pourrait conduire à limiter l'inflammation engendrée par les populations effectrices. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire.

Nous aimerions tester une molécule capable d'activer un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans un modèle animal de cloque cutanée chez le primate-non-humain (PNH) qui apparaît être un modèle pertinent pour évaluer de manière peu invasive les réponses immunes cellulaires chez l'Homme et l'animal, ainsi que le potentiel thérapeutique et l'efficacité de nouvelles stratégies d'immunothérapie. Des travaux précliniques ont déjà été effectués dans différents modèles murins de réaction inflammatoire avec cette molécule prorésolutive et elle a montré une efficacité clinique sur la résolution de l'inflammation.

Une première approche a consisté à injecter en sous-cutané une bulle d'air puis une solution saline contenant un agent inflammatoire, le TNFa, pour mimer le recrutement et l'état inflammatoire d'un patient atteint d'une maladie inflammatoire chronique sur une courte durée (72h au maximum après l'induction de l'inflammation). Après quelques essais de mise en place du modèle chez le primate (précédemment utilisé chez la souris) selon la saisine V1, dans le respect de la règle des 3R, les résultats se sont montrés infructueux.

Nous proposons donc de développer chez le primate le même modèle établi chez l'Homme en essai clinique, ce qui constitue le présent amendement-1, à savoir injection en intradermique d'une bactérie inactivée avec collecte d'exsudat après génération d'une ampoule par succion.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 20. Dans un souci de respect de la règle des 3R, la mise au point du nouveau modèle chez le primate s'effectuera sur des animaux naïfs de ce même projet avant injection de toute molécule ou si disponible sur un animal réutilisé d'un précédent projet à classe modérée. En outre, l'étude de pharmacocinétique/ pharmacodynamique (PK/PD) de la molécule sera, conduite de façon simultanée au modèle de cloque sur les mêmes animaux en parallèle et sur un animal naïf pour évaluer l'impact du modèle en lui-même sur la PK/PD de la molécule thérapeutique. Si le modèle n'a pas d'impact sur la PK/PD, les animaux supplémentaires dits naïfs (qui ne seront pas testés pour le modèle de cloque) ne seront pas utilisés. En outre, l'utilisation d'un anticorps pour cibler les voies de la résolution n'a jamais été testé donc la dose thérapeutique n'est pas connue. Nous avons donc établi un protocole où deux doses différentes pourront être administrées, et selon les résultats préliminaires d'efficacité, le nombre d'animaux pourra être réduit pour ne subsister que ceux prévus pour la dose biologiquement efficace. Par ailleurs, un groupe d'animaux dits « contrôles » (sans traitement) ne recevant que l'agent inflammatoire et une molécule placebo servira de référence pour évaluer l'effet du traitement. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique, qui ne sera pas anti-inflammatoire au vu de la rationalité de ce projet, leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux sont hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités sont 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 mouvements.

16531 La dépendance à la cocaïne, et aux drogues en général, est une pathologie chronique du cerveau qui se caractérise notamment par un fort taux de rechute, parfois longtemps après l'arrêt de la consommation, notamment lorsque l'individu est réexposé à des signaux qu'il a préalablement associés aux effets de la drogue (bouteille d'alcool, odeur de fumées, images de rails de cocaïne, etc.). Le développement de ce comportement désadapté provient de modifications à long terme du fonctionnement de neurones situés dans plusieurs régions cérébrales constituant collectivement le « système de récompense ». Ainsi, de nombreuses modifications ont été démontrées sur les plans de la régulation de l'expression des gènes et de la morphologie des neurones. De récentes études suggèrent qu'il serait possible, en rappelant brièvement le souvenir des signaux associés à la consommation de cocaïne (SSC), d'en atténuer la force et ainsi réduire la capacité de ces signaux à induire une recherche de drogue ultérieurement. Cependant, nous commençons seulement à identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui participent à affaiblir le SSC, et leur compréhension pourra suggérer de nouvelles pistes thérapeutiques dans la prévention de la rechute. Dans ce cadre, nous proposons (I) d'identifier certains effets du rappel du SSC sur la régulation de l'expression des gènes dans le cerveau et sur la morphologie des neurones, et (II) d'intervenir, juste après le rappel, sur des voies de communication intracellulaires dont l'implication est d'ores et déjà fortement soupçonnée (études antérieures) ou sera suggérée par les études de la partie (I).

Maîtrisant la technique d'auto-administration intraveineuse (AAiv) de cocaïne chez le rat, nous permettrons aux animaux de consommer volontairement la cocaïne puis, après avoir induit une forte diminution de leur comportement (en le rendant inefficace pour obtenir la drogue), nous rappellerons le SSC(*) afin (I) de procéder aux études moléculaires et/ou morphologiques, ou bien (II) d'en altérer la force en intervenant directement dans des régions cérébrales d'intérêt et ainsi modifier le niveau de rechute subséquent. Cette étude, qui poursuit des travaux déjà commencés, sera réalisée chez le rat mâle jeune adulte. Le nombre initial d'animaux par lot sera de 15 en tenant compte des pertes éventuelles liées à la non-conformité de certains animaux vis-à-vis des critères comportementaux, et en considérant la variabilité interindividuelle (un nombre minimal de 11-12 individus par condition est

statistiquement suffisant). Au total, nous estimons donc devoir utiliser, pour cette étude, 780 animaux. **REPLACEMENT** : Dans le domaine de la dépendance aux drogues, pathologie éminemment complexe nécessitant l'intégrité du cerveau en fonctionnement normal, il est impossible de s'affranchir de l'utilisation d'animaux vivants. **RAFFINEMENT** : Les animaux sont hébergés dans une animalerie agréée, sous température et hygrométrie contrôlées et relevées quotidiennement. Groupés par 4 (à l'exception d'une période s'étalant de 24h avant chirurgie à quelques jours après chirurgie, durant laquelle ils sont placés en cage individuelle afin de minimiser le stress de la procédure anesthésique et de permettre une récupération optimale), ils disposent de morceaux de bois, permettant le comportement naturel de rongement, régulièrement changés. Il est important de noter que la chirurgie nécessaire à ce type d'expériences est réalisée sous anesthésie générale et sous analgésie locale et générale. Un suivi sanitaire méticuleux, veillant au bien-être de l'animal, est assuré, grâce une grille de notation précise permettant l'évaluation de la souffrance éventuelle du sujet. Si un point critique de la santé de l'animal est atteint, la procédure est interrompue le concernant. Ainsi, la souffrance de l'animal est limitée. Il est important de noter que, jusqu'ici, les cas de souffrance post-opératoires ont été tout à fait exceptionnels (< 1%). **REDUCTION**. Nous avons réduit au maximum le nombre de rats nécessaires aux analyses statistiques en tenant compte (notamment) de la variabilité interindividuelle dans le comportement (15 rats/lot).

(*) Dans la suite de la saisine, le Rappel du Souvenirs des Signaux associés à la Consommation de Cocaïne sera abrégé "RS".

16532 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. Un des peptides les plus puissants est le LL-37. 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*, après les avoir cloné dans une souche d'*Escherichia coli* qu'ils étaient impliqués dans la résistance aux peptides antimicrobiens secrétés par le tractus digestif. Des expériences nous ont permis de prouver que 2 de ces gènes permettaient effectivement une meilleure colonisation du tractus digestif de la souris par *E. coli*. Nous souhaitons maintenant vérifier que cet avantage vient du fait d'une meilleure résistance aux peptides antimicrobiens. Pour cela des souris déficientes pour le gène Cramp (l'homologue murin du gène LL-37) seront gavées par la souche d'*E. coli* possédant ou non un des gènes identifiés. 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 60 souris. 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.

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 n'anticipons pas de souffrance chez l'animal car la souche bactérienne utilisée n'est pas rapportée comme néfaste pour les souris et 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.

16533 L'alpha-synucléine est une protéine agrégée dans les lésions du cerveau des patients atteints de la maladie de Parkinson (« synucléinopathie »). Dans ce projet, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées, qui expriment l'alpha-synucléine humaine et développent au cours du vieillissement des

troubles locomoteurs, menant à une mort précoce de l'animal. Cette maladie apparaît beaucoup plus tôt si l'on injecte dans le cerveau de celles-ci de l'alpha-synucléine présentée sous une forme agrégée. Le but du projet est d'évaluer dans quelle mesure l'injection, directement dans le cerveau, d'une protéine majeure de la bactérie *Escherichia coli*, la protéine curli, sous une forme agrégée pourrait aussi accélérer la maladie de ces souris. En effet des travaux récents chez le rat ont montré qu'une infection orale par une souche d'*Escherichia coli* produisant la protéine curli entraînait une agrégation de l'alpha-synucléine, et une inflammation, dans le cerveau du rat. De tels phénomènes pourraient contribuer chez l'homme à la survenue de la maladie de Parkinson. Dans nos expérimentations, les souris sont hébergées dans des cages enrichies. Le suivi clinique des animaux est réalisé quotidiennement et leur état de santé est évalué grâce à une grille codifiant le niveau de souffrance éventuelle. Cette grille nous permet d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès l'apparition des premiers signes de la maladie (point limite fixé). Ces expériences nécessitent au total 60 souris M83 adultes, nombre réduit au maximum permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables. A l'apparition des premiers signes, l'animal malade est euthanasié. Les résultats de l'étude sont fondés sur l'analyse de la durée de survie des animaux accompagnée d'analyses biochimiques et immunohistochimiques du cerveau permettant notamment de confirmer la pathologie caractéristique de l'alpha-synucléine.

16534 La microgravité réelle dans l'espace ou simulée sur Terre, engendre une migration liquidienne vers la région céphalique provoquant une probable augmentation de la pression intracrânienne dont les effets restent mal connus. La microgravité est connue pour engendrer des effets néfastes sur les systèmes physiologiques, tel que le système cardiovasculaire.

De récents travaux, à la fois chez la souris et chez l'Homme, ont montré qu'une augmentation modérée de la pression intracrânienne s'accompagne d'une augmentation parallèle et réversible de l'activité sympathique. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré l'existence de modifications de l'activité sympathique en microgravité. Cependant, l'origine de cette hyperactivité sympathique reste méconnue. Notre hypothèse est que les variations de la pression intracrânienne puissent être un facteur de modulation de l'activité du système nerveux autonome), notamment de l'activité sympathique, en microgravité.

Les différents objectifs de ce travail de recherche réalisés chez la souris seront 1) d'évaluer l'impact d'une augmentation de la pression intracrânienne sur l'activité du système nerveux autonome, en particulier l'activité sympathique, 2) d'identifier quelles régions cérébrales sont impliquées pour identifier comment ces réponses sont médiées et 3) de développer un modèle d'augmentation de la pression intracrânienne sur le long terme reflétant les effets observés lors des vols spatiaux.

Les retombées de ce projet sont attendues dans le domaine spatial afin d'évaluer les conséquences d'une augmentation modérée de la pression intracrânienne à long terme sur la régulation cardiovasculaire mais aussi dans le domaine de la médecine où de nombreuses situations pathologiques sont caractérisées par une augmentation de la PIC. Ce projet est en accord avec la communauté scientifique en physiologie spatiale avec la mise en place de collaborations avec différentes équipes de recherche, travaillant sur des projets également financés par le Centre National d'Études Spatiales (CNES).

Ce projet sera réalisé dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs. Afin de suivre la règle de raffinement, l'expérimentation fait l'objet de suivi du bien-être des animaux adaptés aux procédures expérimentales, et des potentiels effets indésirables sur leur état de santé global. Les animaux subissant des procédures expérimentales de classe modérée (exemple : chirurgies) sont anesthésiés et analgésiés de manière optimale afin de supprimer une éventuelle douleur ou souffrance. Ils sont également suivis quotidiennement en post-opératoire afin de s'assurer de leur bien-être. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus adaptées pour réduire toute souffrance ou dommage que pourraient ressentir les animaux. L'expérimentation est organisée de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux, c'est pourquoi 100 souris sont nécessaires pour la réalisation de l'étude avec une puissance statistique raisonnable. Il n'existe pas à l'heure actuelle de moyens alternatifs à l'utilisation des animaux, cette recherche intégrée ne pouvant être menée que chez ceux-ci.

16535 Rationnel : Le vieillissement est caractérisé par un déclin graduel des fonctions physiologiques. Ceci entraîne une vulnérabilité accrue aux cancers ainsi qu'aux maladies chroniques liées à l'âge (Alzheimer, Fibrose pulmonaire, Artériosclérose...). Le vieillissement est associé à l'accumulation de cellules « âgées » appelées sénescences c'est à dire des cellules qui s'arrêtent de proliférer de façon définitive et qui présentent un potentiel inflammatoire. Ces cellules sénescences s'accumulent dans nos tissus sains et participent au développement de maladies liées à l'âge comme la Broncho-Pneumopathie Obstructive Chronique (BPCO), la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI), l'artériosclérose ou encore la maladie d'Alzheimer. L'élimination des cellules sénescences représente un enjeu majeur dans le traitement des maladies liées à l'âge depuis environ 5 ans. La fibrose pulmonaire est une des maladies associées à l'âge où les cellules sénescences jouent un rôle défavorable. Notre présent projet est de comprendre comment les cellules sénescences, en particulier celles retrouvées dans la fibrose pulmonaire, s'accumulent au cours du vieillissement afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les éliminer.

Résultats préliminaires : Nous avons identifié que les cellules sénescences retrouvées dans les poumons de souris fibrotiques surexpriment un glycolipide à leur surface. Ce composant de la surface cellulaire est retrouvé très fortement exprimé par les cellules sénescences et inhibe le système immunitaire inné, notamment des cellules tueuses naturelles (NK). Cette inhibition des cellules NK favorise l'accumulation des cellules sénescences dans le poumon. Grâce à un anticorps dirigé contre ce glycolipide, nous avons pu réactiver les cellules NK *in vitro* et forcer l'élimination des cellules sénescences.

Hypothèse : Le ciblage de ce glycolipide par cet anticorps favoriserait l'élimination par le système immunitaire inné des cellules sénescences accumulées dans le poumon et bloquerait ainsi l'évolution de la fibrose pulmonaire.

Objectifs :

- Détailler nos connaissances sur l'expression de ce glycolipide au niveau cellulaire et moléculaire.
- Déterminer si l'inhibition du glycolipide par un anticorps permettrait de bloquer et/ou de résorber l'évolution de la fibrose pulmonaire,
- Comprendre comment ce glycolipide régule les interactions entre cellules sénescences et cellules immunitaires.

Méthodologie : Pour tester le potentiel thérapeutique de cet anticorps, il est indispensable d'utiliser un modèle murin de fibrose pulmonaire. Seul un modèle animal permettra d'appréhender la complexité du système immunitaire et de ses interactions avec ce glycolipide. Le modèle retenu est celui d'induction de la fibrose pulmonaire par injection dans les poumons de bléomycine, un anticancéreux extrait d'une bactérie, grâce à une intubation de la souris (instillation intratrachéale). Ce modèle est très bien décrit dans la littérature et communément accepté pour l'étude de cette pathologie. Le phénotype des souris utilisées est non sévère jusqu'au jour de l'instillation. Bien que le phénotype soit ensuite classé sévère avec des dommages pulmonaires importants et une forte inflammation, seule cette méthodologie apportera la possibilité de mimer la pathologie humaine et nous permettra de comprendre comment les cellules sénescences s'accumulent dans le poumon et pour identifier des approches thérapeutiques contre cette maladie incurable. Les animaux seront suivis périodiquement, avant, pendant et après l'expérimentation, à l'aide d'une fiche de score spécialement mise en place et dédiée à ce protocole. En particulier, l'inflammation marquée du poumon qui précède la fibrose (j7/J14 pour l'inflammation ; à partir du 14ème jour pour la fibrose) est associée à une mortalité. Pour limiter au maximum la souffrance des souris, la fiche de score liste les mesures que nous prendrons pour assurer le bien-être et nous avons défini des points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée.

Plan d'étude : Ce projet comporte 3 procédures

Procédure 1 : Étude spatiale et temporelle de l'apparition du glycolipide et des cellules sénescences pour une compréhension détaillée de la dynamique moléculaire et cellulaire du modèle utilisé.

Procédure 2 : Évaluation du potentiel anti-fibrotique de l'anticorps

Procédure 3 : Analyse histologiques des tissus afin d'obtenir une analyse détaillée de l'état tissulaire et cellulaire du modèle utilisé, avant et après administration de l'anticorps.

Ces expériences ont été pensées en tenant compte de l'éthique (Règle des 3R) et du bien-être animal afin de minimiser au maximum le niveau de stress, d'angoisse, de douleur et/ou d'inconfort potentiels des animaux. Toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées dans le respect de la réglementation européenne en cours.

Réduire : Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, 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. Une étude statistique prévisionnelle (test statistique de Monte Carlo, Logiciel G*Power) nous permet également de prédire le nombre minimal d'animaux à inclure dans chaque groupe. Enfin, la maîtrise du protocole d'instillation intratrachéale permet d'optimiser le succès de la manipulation et d'éviter l'utilisation d'animaux supplémentaires.

Raffiner : Le protocole a été raffiné techniquement : (i) instillation intratrachéale assistée par un fibroscope, ce qui évite une chirurgie ; (ii) expertise du geste technique ; (iii) instillation réalisée sur des souris anesthésiées pour diminuer leur stress et douleur potentielle, (iv) utilisation d'un reversant de l'anesthésique pour faciliter le réveil des souris et (v) utilisation de l'imagerie par scanner (microCT ; technique équivalente au PET-Scan utilisé en clinique pour l'évaluation de la fibrose chez l'homme mais adaptée au petit animal), non invasive, et réduisant ainsi fortement le nombre d'animaux en procédant à un suivi individualisé de chaque souris.

Remplacer : Une partie importante de l'étude est réalisée *in vitro*. Néanmoins, seuls les modèles animaux permettent de tester les relations complexes entre le système immunitaire et les poumons.

Le nombre d'animaux impliqués dans ce projet est de 1720.

16536 Le glyphosate est un herbicide non sélectif à large spectre d'action, appartenant à la famille chimique des acides aminés. Il est utilisé comme désherbant total non sélectif. Le glyphosate a largement été utilisé à travers le monde pour la gestion des adventices, que ce soit pour les pratiques agricoles, la gestion des espaces verts ou par des particuliers. Il s'agit du produit phytosanitaire le plus vendu au monde pour le contrôle des adventices en agriculture, sylviculture et dans les environnements urbains. Récemment, le glyphosate a été accusé de toxicité pour les amphibiens en conditions naturelles. Cependant, les effets du principal métabolite du glyphosate, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) sont inconnus alors que cette molécule fait partie des substances issues de produits phytosanitaires les plus fréquemment retrouvées dans les cours d'eau en France.

Le projet consiste à examiner le développement d'oeufs et de têtards de crapaud épineux (*Bufo spinosus*) dans de l'eau présentant des concentrations d'AMPA qui couvrent les valeurs retrouvées dans l'environnement dans un contexte de contamination chronique.

La règle des 3R a été prise en compte de la façon suivante :

Le Remplacement n'est pas possible car ce projet porte spécifiquement sur le crapaud épineux (*Bufo spinosus*). Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation d'un modèle animal pour cette étude car le suivi cible spécifiquement l'espèce en question.

La Réduction a été prise en compte en limitant au minimum le nombre d'animaux employés. En effet, l'expérience sera menée sur 1800 oeufs issus de 15 pontes alors qu'une femelle adulte pond en général entre 5000 et 7000 oeufs par ponte.

Le Raffinement comprendra le maintien des animaux dans des conditions très proche du milieu naturel. Tout au long de la procédure, les oeufs et les têtards disposeront de conditions de maintien en captivité optimisées. Ils seront maintenus dans des aquariums dédiés, dont l'eau sera changée de façon hebdomadaire et auront un accès à la nourriture ad libitum. Un suivi journalier de l'état de chaque individu et de son aquarium sera effectué. L'avis du vétérinaire référent sera sollicité le cas échéant.

16537 La maladie d'Alzheimer (MA) affecte plus de 900000 personnes en France et il n'existe malheureusement pas de traitement efficace de nos jours. Des travaux récents ont montré que l'absence d'une protéine appelée MT5-MMP dans un modèle de souris transgéniques modèles de la MA, permettait de ralentir fortement le développement de maladie en réduisant les marques pathologiques comme les niveaux du peptide bêta-amyloïde (produit à partir de la protéine APP), les

processus neuroinflammatoires ou encore les capacités mnésiques. Ce projet de recherche consiste à étudier, à mieux comprendre et à caractériser le rôle de MT5-MMP dans le développement de la MA.

Pour cela des souris issues du croisement des souris transgéniques, modèles de MA, et des souris déficientes pour MT5-MMP seront utilisées. La comparaison de ces deux lignées avec leurs homologues non Alzheimer permettra d'évaluer les rôles de MT5-MMP dans la MA. Différentes approches expérimentales seront réalisées : 1) Des cultures primaires de neurones/astrocytes. Ces cultures permettront de mettre en évidence les fonctions de MT5-MMP sur l'activité synaptique, le métabolisme de l'APP et les processus neuroinflammatoires; et 2) Une évaluation de la mémoire et des capacités d'apprentissage, chez des animaux âgés de 2, 4, 6, 9 et 12 mois, à l'aide de différents tests comportementaux qui permettront de mettre en évidence le rôle de MT5-MMP *in vivo* dans la progression de la maladie. Des analyses histopathologiques et biochimiques des cerveaux de ces animaux seront réalisées après évaluation comportementale. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué à 760 animaux (40 femelles et 720 mâles) et 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, c'est-à-dire un minimum de femelles pour générer les embryons pour les cultures de neurones/astrocytes ainsi que des groupes de 12 animaux (hébergés à 3 animaux par cage) par génotypes et par âge.

- L'étude a été raffinée en développant un suivi rigoureux des souris tout au long du protocole. Le bien-être des animaux sera évalué de façon quotidienne en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur. A noter que dans les travaux publiés ayant utilisés ces souris, aucune souffrance particulière ou mortalité n'est mentionnée. Les animaux disposeront de nids végétaux en coton (Neslets) utilisés comme enrichissement de l'environnement ou matériel de nidification, ainsi que des tunnels pour réduire l'ennui et le stress en stimulant l'activité et en procurant un sentiment de sécurité chez l'animal. L'eau et la nourriture sont fournies *ad libitum*.

- 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 un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces jusqu'à des stades avancés.

Ce travail permettra de préciser le rôle de MT5-MMP dans le déclenchement et le développement de la MA. A terme, les données de ce travail pourraient montrer que MT5-MMP constitue une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans la lutte contre la MA et participer au développement de nouvelles stratégies préventives originales de la MA basées sur l'utilisation de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques des effets délétères de MT5-MMP.

16538 Les troubles de la prise de décision sont un symptôme commun à de nombreuses pathologies. Les données cliniques suggèrent qu'ils résultent d'un dysfonctionnement de plusieurs structures cérébrales dont le cortex préfrontal (PFC) et la partie ventrale du striatum, ou noyau accumbens (NAc). En particulier, certaines données suggèrent que ces altérations sont dues à une perturbation, au sein de ces structures, de neurones modulés par la neurohormone dopamine.

Le but de ce projet est de tester directement cette hypothèse en manipulant spécifiquement l'activité des neurones du PFC et du NAc qui sont modulés par la dopamine mais également les neurones qui produisent eux-même la dopamine, et d'évaluer les conséquences sur la prise de décision grâce à des tests comportementaux. Par ailleurs, des données récentes suggèrent que l'exposition à une diète hypercalorique peut conduire à des troubles de la prise de décision, hypothèse que nous testerons dans un sous-groupe d'animaux de ce projet.

Nous prévoyons d'utiliser 450 souris transgéniques mâles C57BL/6J, ce projet s'étendant sur une durée de 3 ans, nécessitant l'utilisation de 4 lignées transgéniques différentes, et 2 technologies différentes pour manipuler l'activité neuronale (positivement ou négativement), l'une permettant une manipulation brève, l'autre prolongée.

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 (règle des 3Rs), appliqués dans notre équipe de recherche : régulation de la température, de l'hygrométrie,

raffinement de l'enrichissement des cages pour améliorer leur hébergement, utilisation d'analgésiques dans le cas de procédures chirurgicales, mise en place de points limites (voir procédures). Ce projet ne peut être réalisé sans l'utilisation de modèles animaux puisqu'il s'intéresse à des dimensions comportementales, non modélisables sur des modèles *in vitro* ou *in silico*. Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles pour le bon traitement des animaux de laboratoire.

Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter les répétitions inutiles.

16539 La pancréatite aiguë est une maladie liée à une auto-digestion du pancréas par ses propres enzymes. Les enzymes sont des protéines dont le rôle est de couper des molécules pour empêcher leurs actions biologiques. La pancréatite aiguë est une maladie mortelle, dont le diagnostic est relativement aisé. Cependant il n'existe pas de diagnostic fiable de la pancréatite chronique. Or celle-ci conduit soit à une pancréatite aiguë soit à un cancer du pancréas. Ce projet inclut la mise au point d'une méthode d'imagerie de la pancréatite sur souris à travers l'activité des enzymes. Cependant, le rôle des protéases (enzymes dédiées à la coupure de protéines) dans la pancréatite est encore très mal connu. L'étude *in vivo* de l'activité enzymatique par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) peut en effet devenir un outil inédit pour l'étude du rôle crucial des protéases lors d'une pancréatite ou de tout autre événement physiologique impliquant des protéases (au cours du développement par exemple). L'IRM est une technique particulièrement intéressante car elle permet d'étudier des phénomènes biologiques en toute innocuité car elle ne fait pas intervenir de radiation, et permet de voir tous les organes en profondeur avec de bons contrastes.

Notre projet sera réalisé à très bas champ magnétique (0,2 Tesla) comparé à ceux utilisés couramment en préclinique pour bénéficier des meilleurs contrastes entre les structures.

Plus précisément, ce projet consistera en la création du modèle animal de pancréatite, puis en la détection de l'activité des protéases par IRM. L'expérience d'imagerie se fera sur animal endormi par l'isoflurane. Elle sera accompagnée d'une injection d'un produit de contraste expérimental dont la mise au point est aussi l'objet de l'étude. Ce produit de contraste sera un radical libre stable et biocompatible agissant comme agent de contraste, et/ou ayant une action spécifique telle que la détection d'une activité protéasique.

En Remplacement d'une partie des animaux, des expériences *in vitro* en présence d'enzymes pancréatiques seront réalisées et permettront une mise au point optimale des propriétés enzymatiques du produit de contraste. Dû au fait que les animaux sont sacrifiés (sans réveil) après chaque expérience, car la pancréatite est irréversible, une Réduction du nombre d'animaux découle d'un travail *in vitro* préalable qui permettra de savoir exactement les doses de produit de contraste nécessaires. Un Raffinement est possible par injection d'un analgésique pendant la période d'induction de la pancréatite jusqu' à l'anesthésie pour l'examen IRM. Les souris seront hébergées 6 par cage, dans des cages contenant de la paille, du bois à ronger, des maisonnettes en polycarbonate, et de l'eau et de la nourriture à volonté. Les souris développant la pancréatite seront isolées de leurs congénères, pendant maximum 12h. Un maximum de 200 animaux est estimé nécessaire afin de tester différentes variantes du produit de contraste sensible aux enzymes pancréatiques.

16540 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 permettant l'augmentation de la régénération osseuse.

Ce projet est un avenant au projet autorisé 15910 pour ajouter l'imagerie non-invasive au projet.

Plus précisément, l'objet de cette étude a pour objet de déterminer la meilleure combinaison matrice de collagène/formulation/ARN permettant la plus longue expression des transgènes *in vivo*, pour ensuite maximiser les capacités de régénération osseuse des matrices de collagène.

Ces expériences sont la suite logique d'expériences réalisées sur des modèles cellulaires classiques et des modèles cellulaires en trois dimensions dans lesquels nous avons démontré l'activité des ARN et matrices.

Des matrices de collagène classique sont déjà utilisées chez l'Homme notamment dans les cas où les autogreffes sont impossibles. L'amélioration de ce type de matrices présente donc un potentiel clinique.

Nous évaluerons les combinaisons matrices/formulation/ARN par imagerie non-invasive sous anesthésie ce qui permet plusieurs prises de vues à différents temps sur les mêmes animaux.

L'apport pour l'Homme est de contribuer au développement de substituts à la greffe osseuse autologue ou hétérologue et de trouver des techniques permettant d'accélérer la régénération osseuse des lésions traumatiques.

Deux types de matrices, trois types de formulation et trois types d'ARN seront évalués.

Nos travaux seront menés dans le respect de la règle des 3R.

Remplacement: ce projet est la suite de résultats obtenus sur des modèles in cellulo, le modèle animal est nécessaire à la validation des hypothèses.

Réduction: l'effectif des souris mis en oeuvre est limité au strict minimum permettant d'obtenir des résultats exploitables statistiquement

Raffinement: les méthodes utilisées seront mises en oeuvre par du personnel formé (niveau chirurgie) et les points limites sont validés par le comité éthique local.

Sous anesthésie, une incision sera faite sur le dos de l'animal avant implantation de la matrice puis suture.

Une procédure d'imagerie non-invasive est prévue pour augmenter le raffinement.

Les souris seront alors imagées à différents temps post implantation. Ce projet permettra de comprendre les cinétiques d'expression des différentes matrices.

Des groupes de 5 souris sont prévus avec un lot de souris non traitées.

Les expériences seront répétées une fois, amenant à un nombre de 100 animaux.

16541 Il est évident aujourd'hui que le système immunitaire a un rôle prépondérant dans diverses pathologies. Outre son rôle principal de défendre l'hôte contre différentes agressions extérieures, telles que les bactéries ou les virus, il est capable dans certaines situations de se retourner contre l'hôte et d'entraîner une inflammation chronique comme dans la maladie de Crohn ou le lupus érythémateux voire la destruction d'un organe dans le pire des cas comme dans le diabète de type I ou la sclérose en plaque. Celui-ci est également l'élément essentiel de la destruction de cellules devenues anormales mais c'est aussi en partie lui le responsable de l'échappement tumoral.

Ces dernières années, la compréhension des différents acteurs d'une réponse inflammatoire que ce soit dans le cas d'auto-immunité, de rejet d'organes, ou de réponse anti-tumorale a mis en lumière l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de cette réponse. Cet équilibre est maintenu par des populations effectrices telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B ou encore les cellules NK qui sont surreprésentées dans les maladies auto-immunes ou les rejets de greffe et des populations régulatrices telles que les lymphocytes régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, principaux médiateurs du développement tumoral et de la rechute dans le cas du cancer.

Les traitements d'immunothérapie actuels visent à contrebalancer cet équilibre. Dans le cas du cancer, les traitements cherchent à améliorer l'action des cellules effectrices ainsi qu'à inhiber la fonction des cellules régulatrices. Dans le cas de l'auto-immunité, les maladies inflammatoires chroniques ou encore le rejet de greffe, c'est l'exact opposé. Ces traitements de plus en plus ciblés visent des gènes spécifiques de l'immunité sur l'une ou l'autre catégorie des populations immunitaires avec pour effet de moduler la réponse immune. Dans le cas du cancer, les voies CTLA-4/B-7 ou encore PD-1/PD-L1 ont eu de très bons résultats en essais cliniques. Dans le cas des maladies inflammatoires chroniques, les

anticorps anti-TNF α ont donné de bons résultats. Ces essais ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques murins. Malgré ces avancées, les rechutes sont encore trop nombreuses et il est essentiel de chercher d'autres molécules et d'autres combinaisons.

Dans notre laboratoire, nous avons identifié une nouvelle cible immunitaire exprimée par les cellules d'origine myéloïde comme les monocytes, macrophages ou encore les cellules myéloïdes suppressives et pour lequel il existe une souris déficiente pour ce gène : le gène SIRPa. Nous avons d'ores et déjà testé un traitement ciblant ce gène dans deux modèles de cancer en combinaison à d'autres traitements ciblant le système immunitaire. Cette première étude nous a permis de démontrer l'efficacité thérapeutique de ce traitement en combinaison dans au moins un des modèles et d'identifier les médiateurs cellulaires impliqués dans cette efficacité. Nous avons aussi pu démontrer que l'effet de notre traitement était similaire à celui observé chez la souris mutante.

Dans cette nouvelle étude, nous souhaiterions dans un premier temps tester l'efficacité de notre traitement dans d'autres modèles tumoraux chez la souris, étape indispensable avant de pouvoir tester un traitement en clinique, notamment car chaque cancer est différent. De plus, parce que SIRPa a un rôle important sur les cellules myéloïdes et au vu des effets observés dans la première étude, nous souhaiterions étudier son implication dans d'autres pathologies inflammatoires autre que le cancer. La souris mutante pour SIRPa est ici un moyen important de démontrer scientifiquement l'efficacité du traitement SIRPa d'une autre manière.

Le nombre d'animaux utilisé sera de 3030 souris (réparties dans 7 modèles différents, selon 4 axes par modèles, et 3 à 6 groupes par axe) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Selon les modèles proposés, le nombre d'axes par modèle pourra être diminué selon les résultats de l'axe précédent, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. 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.

16542 Dans le monde, 190 000 nouveaux cas de cancer du rein apparaissent chaque année. Le cancer du rein est le troisième cancer urologique après le cancer de la prostate et le cancer de la vessie. Représentant 3% des cancers de l'adulte, le cancer du rein touche deux fois plus les hommes que les femmes, en particulier après 50 ans. Dans la grande majorité des cas, il est diagnostiqué de façon fortuite, au cours d'un examen réalisé pour une autre raison.

La chirurgie est le traitement de référence du cancer du rein. La tumorectomie (ablation de la tumeur en préservant le rein) est de plus en plus pratiquée. Elle consiste à ouvrir la paroi de l'abdomen pour retirer la tumeur, une partie ou la totalité du rein (néphrectomie). Les traitements classiques, comme la chimiothérapie et la radiothérapie, ne sont pas actifs sur ce type de cancers. 80% des patients sont encore en vie cinq ans après la détection de leur cancer. Ce pronostic est beaucoup plus sombre lorsque le mal est découvert à un stade avancé et qu'il existe des métastases.

Principalement 2 approches sont utilisées pour mimer les événements biologiques associés aux processus de cancer : une approche *in vitro*, basée sur l'utilisation de lignées cellulaires ou de cellules cancéreuses isolées et des approches *in vivo*, basées sur l'utilisation d'animaux de laboratoire, chez lesquels des tumeurs cancéreuses sont transplantées. Les modèles *in vitro* ne recréent ni la diversité de l'environnement des tumeurs, ni la difficulté pour une molécule testée d'atteindre les cellules cibles. De plus, il est impossible d'étudier le développement métastatique dans ces modèles. Ces limitations rendent donc incontournables le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouvelles molécules antitumorales.

L'objectif de cette étude est de mettre en place des modèles de cancer du rein chez le rongeur, pour permettre l'évaluation de nouvelles molécules anticancéreuses. 2 modèles seront développés :

- Modèle sous cutané qui n'induit pas de développement métastatique donc moins représentatif de la physiopathologie humaine mais qui est une approche moins sévère et qui a eu encore récemment le mérite de mettre en évidence l'activité de molécules devenues par la suite des médicaments.

- Modèle orthotopique (intra-rénal) qui consiste en une implantation tumorale au niveau de son site anatomique d'origine. Ce modèle permet à la tumeur d'acquies un comportement invasif plus proche de la réalité clinique et de générer des métastases à distance (ganglions lymphatiques, poumon...). Ce modèle, plus sévère, est néanmoins plus proche de la physiopathologie cancéreuse et donc est plus prédictif.

Le nombre de souris et de rat nécessaire à cette étude est de 1040 et 270, respectivement en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Nous estimons sur 5 ans tester soit environ 25 molécules avec 3 doses différentes soit 75 molécules à une seule dose.

La croissance tumorale et le développement de métastases seront suivis au cours du temps (jusqu'à 6 semaines) par des techniques non-invasives, mesure au pied à coulisse, mesure par imagerie de luminescence. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal, permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement adapté à l'espèce sera rajouté aux animaux (des refuges en polycarbonate, carrés de coton, aspen brick...). En accord avec la règle de raffinement, les procédures anesthésiées seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermorégulée. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours, le suivi étant assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie le week-end. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

De plus, une des procédures de ce projet est classée comme une procédure sévère, ce qui implique qu'à la fin de ce projet une évaluation rétrospective, par le comité d'éthique, sera réalisée.

16543 Le diabète de type 1 représente aujourd'hui un problème majeur de santé publique et concerne plus de 30 millions de personnes dans le monde. Cette maladie provient de la destruction auto-immune des cellules bêta insulino-sécrétrices des îlots endocrines du pancréas. Malgré l'instauration d'une insulinothérapie, le plus souvent très efficace pour traiter l'hyperglycémie chronique caractéristique de cette maladie, des complications multiples et graves peuvent se développer à court terme (hypoglycémie, acidocétose, coma) ou long terme (atteintes rénales, cardio-vasculaires, oculaires ...). Dans certaines indications, l'allogreffe d'îlots pancréatiques dans le foie est une alternative ou un complément thérapeutique nécessaire à l'insulinothérapie. Cependant, la pénurie d'organes, la perte de viabilité de presque la moitié des îlots pancréatiques greffés et la nécessaire utilisation d'immunosuppresseur pour prévenir ou retarder le rejet des îlots greffés limitent la greffe d'îlots pancréatiques humains en clinique à quelques patients seulement. Nous avons développé et optimisé un prototype de pancréas bioartificiel encapsulant, dans de l'alginate immunoprotecteur prévenant l'usage d'immunosuppresseurs, les îlots pancréatiques à très haute densité, garantissant ainsi une taille compatible avec une transplantation peu invasive en sous-cutanée. L'optimisation d'une solution d'apport et de contrôle du transfert d'oxygène aux îlots pancréatiques encapsulés assurera leur survie et leur fonctionnalité après transplantation. Ce pancréas bioartificiel très innovant a été validé avec succès *in vitro* et peut embarquer des îlots humains et des îlots porcins comme alternative. Les résultats précliniques récents et prometteurs en matière de xénotransplantation d'îlots porcins encapsulés sans immunosuppression ouvrent la voie à l'utilisation de ces îlots dans les approches thérapeutiques du diabète de type 1. L'objectif de ce projet est la validation préclinique, dans des modèles murins adaptés, de (1) l'efficacité de ce pancréas bioartificiel embarquant des îlots humains et porcins dans la correction du diabète et (2) de confirmer sa biocompatibilité.

Le design expérimental respectera la règle des 3R:

- Réduction. Le nombre total d'animaux utilisés dans ce protocole est de 58 souris. Ce nombre est le minimum requis pour pouvoir valider la biocompatibilité de notre dispositif de pancréas bioartificiel et son efficacité en termes de correction du diabète.

- Remplacement. Les modèles retenus sont des modèles murins pertinents permettant d'évaluer *in vivo*, passage obligatoire avant les essais cliniques, les deux situations cliniques permises par notre pancreas bioartificiel (allotransplantation et xénotransplantation).

- Raffinement. Au cours des transplantations, les animaux seront systématiquement anesthésiés et sous analgésie. Une surveillance régulière sera réalisée tout au long de la phase de réveil et les jours suivants, quotidiennement. Une grille comportementale est mise en place afin de permettre une évaluation de la douleur chez les animaux, ainsi que les critères limites pouvant justifier l'arrêt prématuré du protocole. Le bien-être animal est pris en compte par des personnels compétents, de l'arrivée des animaux jusqu'à leur mise à mort (enrichissement des cages (tunnel, nid à usage unique), changements et nettoyages des cages, espaces aux normes adaptées, surveillance quotidienne des animaux ...).

16544 Les chercheurs de l'Institut explorent des thématiques très diverses, alliant recherche fondamentale et appliquée dans le domaine de la santé. Leurs résultats scientifiques ont déjà permis d'importantes avancées, notamment pour la compréhension de nombreuses pathologies humaines comme certains cancers ou maladies génétiques rares.

Si de nombreuses études sont réalisées *in vitro*, dans l'état actuel des connaissances nous ne pouvons pas nous passer du recours aux animaux pour les études. Dans ce cadre, de nombreux modèles de souris transgéniques, pour la plupart mimant des maladies humaines ou animales sont créés et échangés entre laboratoires.

Le projet présenté vise en premier lieu à permettre le transfert des lignées entre les animaleries en préservant l'état sanitaire des animaux. Pour cela, nous produisons des embryons par croisement des animaux (femelles et mâles fertiles), en induisant une stimulation hormonale des femelles pour augmenter le nombre d'ovules fécondables. Les embryons ainsi produits sont prélevés et transférés par voie chirurgicale sous anesthésie générale dans des mères porteuses de statut sanitaire contrôlé dans l'animalerie de destination. Pour obtenir des femelles capables de recevoir ces embryons et de mener la gestation à bien jusqu'à la naissance des petits, il faut croiser ces femelles adultes avec des mâles vasectomisés. Cet accouplement permet de préparer physiologiquement la femelle à la gestation. Les petits obtenus sont débarrassés de tout germe potentiellement infectieux pouvant nuire à la santé des animaux et à la qualité de la recherche.

Ce projet vise également à mettre en sécurité les lignées de souris sous forme d'embryons. En effet, cette technique de congélation permet de préserver les lignées transgéniques pendant des décennies sans nécessité de garder des animaux vivants. On réduit de ce fait considérablement le nombre d'animaux utilisés pour le maintien d'une lignée, mais on la préserve aussi d'une perte occasionnée par une infection ou tout autre évènement imprévu (incendie, catastrophe naturelle...)

De plus, la forme congelée facilite les échanges de modèles avec d'autres laboratoires à travers le monde tout en évitant le stress lié au transport d'animaux vivants.

En moyenne, nous réalisons le transfert de 20 lignées et la congélation de 40 lignées par an sous forme d'embryons congelés. Nous utilisons pour les transferts de lignée 160 femelles et 45 mâles par an, soit en tout 1025 souris en 5 ans. Pour la congélation d'embryons, nous utilisons 840 femelles par an, soit 4200 souris en 5 ans.

Remplacement : la préservation à long terme se fait grâce à des embryons plutôt qu'à des animaux vivants, ce qui permet d'éviter d'utiliser des animaux en élevage.

Réduction : la congélation permet de réduire le nombre d'animaux pour préserver la lignée, la stimulation hormonale en induisant la production d'un grand nombre d'ovules diminue également le nombre de femelles nécessaires. Faciliter les échanges entre laboratoires est aussi une source de réduction car cela limite la nécessité de créer plusieurs fois le même modèle dans des laboratoires différents. De plus les lignées échangées sont généralement déjà bien connues et caractérisées, ce qui limite aussi la nécessité de nouvelles études.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupes dans des cages présentant un enrichissement adapté (nids). Les mamans porteuses réimplantées sont placées en cage par 2 et surveillées quotidiennement jusqu'à la mise bas et ensuite jusqu'au sevrage des petits. La chirurgie de

réimplantation et de vasectomie est réalisée sous anesthésie générale, utilisant un anesthésique associé à une analgésie afin de limiter toute souffrance ou stress de l'animal.

16545 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 de déclencher 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.

16546 L'épilepsie de type "petit mal" ou "absence" chez l'enfant représente 2-8% des épilepsies. Les crises sont caractérisées par une perte de conscience brève, un regard fixe et pas de signe moteur majeur chez les patients, qui montrent au même temps des activités cérébrales électriques caractéristiques. Les absences sont retrouvées dans des maladies dévastatrices avec un retard de développement et des déficiences mentales telles que le syndrome de Dravet ou de Lennox-Gastaut. Contrôler les crises d'absence pourrait pas seulement améliorer la qualité de vie des patients mais aussi leur développement cognitif. Les médicaments disponibles à ce jour ne fonctionnent que partialement chez le patient.

Nous proposons de tester des nouveaux composés pharmacologiques dans un modèle d'absence chez la souris. Ces composés ciblent une protéine du cerveau nommée mGlu7 et offrent une alternative potentielle aux médicaments utilisés en clinique. Nous étudierons aussi si ces composés peuvent interagir avec deux médicaments donnés aux patients (éthosuximide et valproate) pour en améliorer l'efficacité. De plus, nous souhaitons comprendre les mécanismes moléculaires utilisés par mGlu7 pour moduler les crises d'absence. Pour cela nous allons augmenter ou diminuer la quantité de mGlu7 présente dans des régions du cerveau impliquées dans les crises épileptiques.

Nos résultats visent à fournir des informations précliniques pour mieux traiter les crises d'absence.

La règle des 3R sera appliquée de la façon suivante:

Réduire: Pour ce projet nous envisageons d'utiliser 832 souris sur une période de 4 ans. Ce nombre a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés sans compromettre la validité statistique des expériences qui seront menées. L'avancement des résultats nous guidera pour que seules les expériences considérées comme absolument indispensables soient réalisées.

Raffiner: Les animaux seront hébergés en groupe sauf lors de l'implantation des dispositifs nécessaires pour enregistrer l'activité cérébrale, afin d'éviter le risque de blessure mutuelle (par ex. connecteurs arrachés). L'environnement sera enrichi (copeaux, morceaux de coton, papier). 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: Les composés utilisés sont au préalable étudiés sur des systèmes alternatifs (cultures de cellules *in vitro*) afin de déterminer la dose efficace, en diminuant ainsi le nombre de doses à tester *in vivo*. Par contre il nous est impossible de remplacer l'animal vivant pour l'étude de l'épilepsie.

16547 L'incontinence urinaire est un écoulement involontaire, non contrôlable, des urines par l'urètre constituant un problème social ou/et d'hygiène. Il s'agit avant tout d'une déficience, dont le handicap généré entraîne une gêne variable selon les individus et les sociétés dans lesquelles ils évoluent et qui touche tous les âges et les deux sexes.

Il existe plusieurs formes d'incontinence urinaire selon le mécanisme de survenue. Dans ce projet nous allons principalement étudier l'incontinence d'effort, caractérisée par une fuite involontaire des urines, non précédée par un besoin d'uriner et survenant à l'occasion d'un effort (saut, port de charge, toux, rire, ...). Elle est due à une altération des structures de soutien de la vessie, de l'urètre et de son sphincter. Elle est rencontrée le plus souvent chez la femme en contexte de lésion sévère post-obstétricale ou chez la femme âgée dans un contexte multifactoriel. Chez l'homme, elle survient principalement comme complication de la chirurgie du cancer de la prostate ou de la vessie. Les causes de traumatismes (traumatisme de la moelle par exemple) sont également présentes pour les deux sexes.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la fonction urétrale en condition d'incontinence urinaire par enregistrement du profil mictionnel (utilisation de cages métaboliques), mesure de l'activité de l'urètre chez le rat éveillé ou anesthésié. 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 vésicale 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 de l'urètre, 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 urétrale dans son ensemble n'existent pas : c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter l'incontinence urinaire.

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 l'induction de l'incontinence urinaire puisqu'il s'agit de développement de nouvelle technique au sein de l'équipe 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.

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.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sur 5 ans sera de 4090 rats. En raison de 12 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. L'efficacité des molécules pourra être évaluée selon 2 approches différentes (analyse mictionnelle, activité de l'urètre) 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).

16548 Les diarrhées à *Clostridium difficile* constituent un problème de santé publique, notamment du fait des infections récidivantes résistantes aux antibiothérapies conventionnelles. La transplantation de microbiote fécal (TMF) donne de très bons résultats dans le traitement de ces récives mais l'accès à cette thérapie est limité du fait de l'utilisation de selles fraîchement émises par le donneur. Notre objectif est de définir les préparations fécales lyophilisées permettant de maintenir l'efficacité du traitement et facilitant l'accès de ce traitement aux patients. L'impact de la TMF sur le microbiote intestinal et sur le dialogue microbiote-hôte, notamment le dialogue microbiote-système immunitaire, est extrêmement complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible les infections à *C. difficile* permettra d'évaluer la meilleure préparation lyophilisée de selles permettant une TMF efficace. Les souris seront tout d'abord traitées par un cocktail d'antibiotiques pendant 3 jours suivi à 48 heures d'une administration en bolus de clindamycine pour perturber le microbiote intestinal puis elles seront infectées par *C. difficile* (modèle ICD). Un jour après l'infection, elles seront traitées par TMF. La colonisation par *C. difficile* et le microbiote intestinal seront suivis dans des prélèvements fécaux. Après 10 jours, les souris seront euthanasiées pour prélever des organes afin d'étudier les lésions intestinales et l'immunité. L'impact de la TMF sur l'équilibre du microbiote intestinal et la physiologie du côlon sera étudié. Le nombre de souris sera de 915.

Principe des 3 R : nous sélectionnerons préalablement *in vitro* les préparations fécales lyophilisées à tester *in vivo*. Une surveillance bi-quotidienne des animaux est prévue. Des points-limites ont été établis, entraînant la mort anticipée de l'animal si nécessaire. A terme nous aurons identifié les caractéristiques des préparations fécales lyophilisées permettant une transplantation de microbiote

fécal lyophilisé aussi efficace qu'avec des selles fraîches pour une application thérapeutique chez l'homme.

16549 Améliorer l'efficacité thérapeutique des traitements anticancéreux actuels tout en limitant les effets secondaires est une préoccupation majeure en cancérologie.

Un des axes de recherche développé dans cet objectif est la fabrication de systèmes moléculaires pouvant être activés directement au sein de la tumeur. Ce ciblage va permettre de concentrer l'effet thérapeutique directement au niveau de la cible du médicament (la tumeur) et d'en limiter l'impact sur les tissus sains.

Le système que nous avons développé est une sonde théranostique c'est-à-dire capable à la fois d'être détectée par imagerie *in vivo* et d'induire une action thérapeutique après administration.

Sa particularité est de pouvoir être déclenchée par un stimulus externe : on va donc pouvoir contrôler son effet dans le temps pour initier l'effet pharmacologique au moment idéal. La sonde sera déclenchée par des rayonnements de type X ou gamma d'énergie similaire à ce qui est utilisé chez l'Homme pour les traitements par radiothérapie, ce qui en fait un outil adapté à l'utilisation en clinique.

Lors du déclenchement par rayonnements, la sonde va causer des "trous" dans les membranes des cellules cancéreuses. Ces trous peuvent directement détruire les cellules et/ou laisser entrer les principes actifs qui seraient administrés après le traitement avec la sonde.

Cette approche est unique et ouvre des perspectives très prometteuses pour le traitement de tumeurs résistantes aux chimiothérapies classiques ou à la radiothérapie.

La sonde a subi de nombreux tests pour valider sa structure et vérifier son efficacité *in vitro* sur cellules cancéreuses (Remplacement). Il est maintenant indispensable de passer sur l'animal pour vérifier l'innocuité et l'efficacité de la sonde dans un organisme vivant intégré et autonome.

Trois sondes de conformation différente seront administrées chez la souris en vue :

- de vérifier l'innocuité de chaque sonde *in vivo*, chez la souris saine
- d'évaluer la distribution de la sonde après administration chez une souris porteuse d'une tumeur cérébrale. Ceci doit nous permettre de vérifier que la sonde injectée chez l'animal atteint bien la tumeur, point crucial pour l'utilisation thérapeutique de la sonde.

Cette étude nécessitera au maximum 96 souris. Ce nombre a été défini de façon à limiter le nombre d'animaux inclus dans l'étude tout en s'assurant d'obtenir des informations fiables et exploitables.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance.

16550 L'étude de la fonction cardiovasculaire est un élément incontournable dans le développement préclinique des médicaments, répondant aux textes réglementaires ICHS7a et ICHS7b, incontournable dans le développement préclinique des médicaments. Pour la fonction cardiovasculaire, les effets tensionnels et électrocardiographiques doivent être caractérisés en portant une attention particulière à l'étude de la repolarisation ventriculaire car la prolongation de celle-ci est un facteur de risque majeur dans la survenue de troubles du rythme, comme les torsades de pointes (TdP). L'évaluation du risque arythmogène se fait très tôt dans le développement de candidats médicaments grâce à des modèles mathématiques, l'évaluation des effets sur les canaux à l'aide de cellules transfectées ou sur des cardiomyocytes humains issus de cellules pluripotentes. Mais ces méthodes ne permettent pas l'évaluation sur une cellule entière, mature et fonctionnelle contrairement à l'enregistrement de potentiel d'action issu de la fibre de Purkinje ou de muscle papillaire et d'électrocardiogramme de surface de cœur isolé. Ces études *in vitro*, conduites le plus souvent chez le lapin (fibres de Purkinje et cœur isolé) pour son analogie avec l'homme au niveau des canaux présents dans les cellules cardiaques permettent de ne sélectionner pour les études *in vivo* que les candidats médicaments ne présentant que peu de risques d'arythmies. Il est parfois nécessaire de poursuivre les investigations par l'évaluation du risque arythmogène sur des modèles de muscles papillaires chez le cobaye (pour l'évaluation de la fonction contractile ventriculaire) et/ou des modèles de cœur isolé chez le rat

(évaluation des fonctions vasculaires dans le modèle de cœur isolé). Ces études, chez le cobaye et chez le rat, sont ponctuelles et répondent à une recherche mécanistique particulière. Dans tous les cas, pour effectuer ces études ex-vivo, il faut prélever le cœur de l'animal. Pour cela l'animal est anesthésié, puis euthanasié et le cœur est très rapidement prélevé. Les méthodes d'anesthésie et d'euthanasie sont adaptées à l'espèce. Il n'est pratiqué aucun autre geste préalable à l'anesthésie. Les données internes du laboratoire portant sur plusieurs dizaines de molécules de références permettent de limiter le nombre d'animaux par étude à 3 pour un même produit tout en testant plusieurs concentrations (entre 4 et 5 concentrations maximum pour un même prélèvement). Tous les expérimentateurs ont suivi les formations réglementaires nécessaires à la pratique de l'expérimentation animale. Ils sont ainsi formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, les prélèvements sont réalisés en respectant les recommandations éthiques spécifiques à chaque espèce relative aux modalités d'expérimentation et visant à prévenir toute douleur ou détresse de l'animal. Le nombre d'animaux utilisé sur 5 ans se décompose comme suit : 1400 lapins, 50 rats, 50 cobayes.

16551 Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant d'évaluer leur effet sur la perception de la douleur chez l'animal ou de reproduire des modèles de douleur et de tester l'efficacité de substances pharmacologiques. A ce jour, la prise en charge de la douleur chez l'Homme est encore trop limitée et les conséquences ont un impact sociétal important (médical, psychologique, professionnel, social, familial). Il est important de développer de nouvelles molécules (dérivés opioïdes, anti-inflammatoires), plus efficaces que celles actuellement proposées mais aussi permettant de mieux cibler les traitements et de limiter les effets secondaires. Les modèles de douleurs chez l'animal ont pour but de mimer des douleurs cliniques de différents types : inflammatoires, neuropathiques, viscérales, post-opératoires.... Ces modèles peuvent être aigus et/ou chroniques. Les substances pharmacologiques évaluées sont généralement codées et peu d'informations nous sont transmises ; il arrive que les récepteurs cibles ou la famille pharmacologiques soient indiqués ce qui nous permet d'affiner le protocole expérimental en conseillant une voie d'administration pertinente ou une durée de traitement par exemple.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en oeuvre à grande échelle au sein de différents laboratoires spécialisés dans cette approche comportementale. Ces tests nécessitent l'utilisation d'animaux (préférentiellement les rongeurs) et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur la réponse de l'animal à une stimulation douloureuse de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre total d'animaux (toutes espèces confondues) qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 12195. Très ponctuellement, le lapin, le chien ou le porc pourraient être requis et le nombre estimé nécessaire de ces espèces est de 30 lapins, 15 chiens et 30 porcs. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse. La douleur liée à ces modèles animaux est maîtrisée et connue (elle est graduée en 3 stades : légère, modérée et sévère). Nous sommes très vigilants aux différents commentaires du personnel au contact des animaux et nous ajustons spécifiquement nos procédures. Il est important de bien prendre conscience que la réponse de l'animal à une stimulation douloureuse nécessite que cet animal soit dans un état d'éveil, de conscience et de capacité de réaction le plus optimum possible, il est donc primordial pour nous de bien évaluer l'état général des animaux et de parfaitement définir les points limites qui pourraient être observés pour que l'évaluation pharmacologique des substances ne soient pas mal interprétée. Nous savons que c'est par ces études que nous permettons le développement et la mise sur le marché de nouvelles substances thérapeutiques pour l'Homme.

16552 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 de lait et des prélèvements sanguins sur des lapines à partir du stade nullipare pour compléter nos mesures zootechniques non invasives (pesées, suivi de consommation), pour évaluer l'impact de la nutrition sur la lactation et de comprendre la croissance des lapereaux (paramètres de santé, d'immunité, composition du lait, ect...).

Pour prélever le lait, une injection de 0.2mL d'oxytocine (dosée 10UI/mL) en intramusculaire est réalisée à la cuisse avant le prélèvement pour faciliter la coulée du lait lors du prélèvement. La lapine est également stimulée par l'allaitement des lapereaux pendant quelques minutes avant le prélèvement. Le prélèvement se fait par une traite de la mamelle. La procédure est de classe légère puisque l'injection oxytocine correspond à l'introduction d'une fine aiguille durant une courte durée du fait de la faible dose injectée. De plus, la durée du prélèvement de lait est rapide puisque le volume prélevé est faible.

Concernant les prélèvements 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 (1% du volume sanguin par prélèvement). La durée de la prise de sang est très rapide du fait du très faible volume prélevé.

Les prélèvements de lait et de sang sont réalisées sur un échantillon limité d'animaux déterminé par une analyse statistique préalable. Ainsi des prélèvements de lait et de sang seront effectués sur 800 lapines maximum sur les 5 ans. Le nombre de prélèvements de lait et de sang réalisés sur chaque animal est en moyenne de 4 par an (4 prélèvements de lait et 4 prélèvements de sang).

La contention est réduite au minimum nécessaire pour effectuer l'injection, le prélèvement de lait et le prélèvement de sang sont réalisés dans les conditions de sécurité pour l'animal et les opérateurs. Les prélèvements de lait et de sang sont réalisés par des opérateurs qualifiés, habitués à manipuler les animaux.

Toutes les 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 par les opérateurs. De plus, pour les prélèvements de sang la contention est réalisée dans une boîte (adaptée à la taille de l'animal) limitant les mouvements de la lapine, dans une obscurité rassurante et laissant juste sortir l'oreille à prélever.

A la fin de chaque essai, les lapines continuent leur cycle d'élevage classique.

16553 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-spinal (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 pronostiques.

Or, il s'agit de la tumeur intracérébrale qui a le plus de propension à donner des métastases, présentes dans 30 à 35% des cas, au niveau du système nerveux central sous la forme de nodules au niveau de l'encéphale et/ou du névraxe ou d'une méningite tumorale.

Le traitement standard actuel comprend la chirurgie, la chimiothérapie et/ou radiothérapie. Bien que ces traitements améliorent la survie, les chances de guérison restent faibles, en particulier pour les formes à haut risque en raison de récurrences ou de métastases à l'intérieur ou voire à l'extérieur même du système nerveux central.

Le développement d'outils d'imagerie adaptés est capital dans la mesure où ils permettent un diagnostic fiable et précoce de la pathologie et assurent la visualisation de l'étendue de la maladie. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) des régions encéphaliques et cervico-dorso-lombaires constitue la technique de référence pour le diagnostic du médulloblastome. Cependant, son application

en Recherche Préclinique, notamment sur des animaux de petite taille comme les rongeurs constitue un réel obstacle de par son manque de résolution. Ainsi, la présence de micro-foyers tumoraux d'origine métastatique peuvent ne pas être détectés chez la souris. Un autre type de bilan pré-chirurgical en cas de médulloblastome constitue la « cytologie du LCR » avec nécessité de savoir ponctionner ce fluide sans altérer les fonctions de l'animal.

C'est pourquoi, nous nous sommes tournés vers l'imagerie par bioluminescence. En effet, notre plateforme dispose d'une caméra permettant de visualiser et d'analyser le signal émis par les cellules tumorales transfectées nécessaires à l'utilisation de ce type d'appareillage. L'avantage associé à cette technique d'imagerie réside dans le fait qu'elle est non invasive, très résolutive, accessible et rapide à effectuer.

Nous proposons de mettre en place un modèle « *in vivo* » sur des souris femelles nude via une injection intrathécale (sous l'arachnoïde) de cellules afin de proposer un modèle plus pertinent. En effet, une étude préliminaire basée sur une injection stéréotaxique dans le cervelet, nous a permis de caractériser cette tumeur mais a aussi soulevé les limites de cette méthode, à savoir un manque de dissémination dans les voies lepto-méningées pouvant être à l'origine de l'échec des armes thérapeutiques.

Afin de mettre en place et de caractériser ce modèle *in vivo* de tumeurs de médulloblastome reflétant la pathologie décrite dans les cas cliniques (voies de dissémination similaires, foyers multiples...), l'imagerie par bioluminescence se révèle être l'outil d'imagerie le plus approprié.

Dans ce cadre, l'étude préclinique sera réalisée sur 15 souris au maximum.

Une première étude « *in vitro* » a déjà été menée afin d'apporter une validation de concept et d'optimiser au mieux l'utilisation de l'imageur et des logiciels associés (REPLACEMENT), le but étant d'établir un protocole expérimental pertinent sur des lignées cellulaires tumorales transfectées. Nous devons maintenant évaluer la stratégie *in vivo*. Le REPLACEMENT des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans notre contexte : l'utilité même d'une caméra à bioluminescence est de permettre un suivi *in vivo*.

A cet effet, la mise en place de ce modèle sera réalisé sur 15 souris femelles nude. L'évaluation de la cinétique de croissance tumorale sera évaluée par un suivi longitudinal des animaux par Imagerie par Bioluminescence permettant de réaliser les examens dans le temps sur un même animal et ainsi de réduire le nombre d'animaux (REDUCTION).

Le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes seront effectuées (implantation de la tumeur, imagerie). En outre, les animaux seront mis à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (RAFFINEMENT) comme l'apparition d'altérations fonctionnelles (troubles de la locomotion, de l'équilibre, tremblements) ou de son comportement (surexcitation). La durée de l'étude ne dépassera pas 5 semaines. Le suivi par imagerie de bioluminescence permettra de déterminer l'évolution tumorale et d'anticiper l'expérimentation précocement avant l'apparition d'éventuels symptômes.

16554 La greffe de moelle osseuse est le seul traitement permettant la guérison de certaines tumeurs du sang comme les leucémies. L'effet antitumoral de la greffe est lié à la reconnaissance des cellules cancéreuses du receveur par le système immunitaire du donneur. 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 parfois 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 antitumoral de la greffe. Parmi les stratégies intéressantes, l'injection de cellules régulatrices capables de diminuer la GvH est une voie de recherche prometteuse. Ainsi, les Cellules Souches Mésoenchymateuses de Moelle Osseuse (CSM-MO) de donneur ont été rapportées comme potentiellement efficaces 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 est avancé. La

gelée de Wharton (CSM-GW) 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. Les CSM-GW ont été largement étudiées et possèdent les mêmes propriétés que les CSM-MO. Les mécanismes d'interaction des CSM-GW avec le système immunitaire ont déjà été étudiés *in vitro* au sein de notre unité de recherche et ont donné des résultats encourageants. Dans l'optique d'un traitement de la GvH par les CSM-GW, il est nécessaire, dans un premier temps, de localiser des CSM-GW injectées, dans un modèle *in vivo* murin de GvH (induite par injection de cellules sanguines mononucléées humaines). L'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positron) représente une technique intéressante qui permet de tracer et de suivre le parcours des cellules marquées dans l'organisme. Le Zirconium-89 ([⁸⁹Zr]) est un radiotraceur qui a la particularité de pouvoir entrer dans les cellules et les marquer afin de pouvoir tracer et suivre leur localisation pendant plus de 7 jours.

Objectif : localiser les CSM-GW humaines marquées par du 89-Zirconium chez la souris après injection intra-veineuse.

Description des différentes modalités expérimentales :

27 souris NOD/SCID/Gamma-c KO réparties en 4 groupes seront constituées et auront un examen d'imagerie TEP :

- a- Un groupe (n=3) contrôle qui recevra une injection [⁸⁹Zr] seul sans injection de cellules.
- b- Un groupe (n=8) qui recevra une injection de 3 millions de CSM-GW marquées au [⁸⁹Zr].
- c- Un groupe (n=8) qui recevra une injection de 3 millions de CSM-GW marquées au [⁸⁹Zr] après 48h de culture en présence d'Interferon γ (INF γ) à 100 ng/mL (CSM-GW-IFN, cellules plus efficaces dans la prévention de la GvH dans les travaux préalables non publiés de l'équipe).
- d- Un groupe (n=8) qui recevra une injection de 3 millions de CSM-GW-IFN marquées au [⁸⁹Zr] dans un modèle de GvH obtenu par irradiation à 2 Gy des souris NSG à J-1 et injection de 5 millions PBMC humains (Cellules souches mononucléées du sang périphérique) à J0.

Le suivi du devenir des CSM-GW sera réalisé par TEP à T+2h, J1, J4 et J7.

A la fin du 7e jour, les animaux seront mis à mort afin de réaliser des analyses histologiques permettant de confirmer les résultats obtenus *in vivo*.

Stratégie mise en place pour le respect des 3R :

Ce nombre d'animaux a été calculé en amont afin d'utiliser le moins d'animaux possible en se basant sur les expériences de l'équipe, travaillant depuis plusieurs années sur ces cellules et l'expertise en imagerie des collaborateurs en médecine nucléaire (Réduction).

2/ L'analyse de la localisation des CSM-GW marquées ne peut être réalisée que sur un modèle animal permettant par la suite d'analyser leur capacité de rétention au sein de l'organisme et d'envisager leur potentiel thérapeutique (Remplacement).

3/ Enfin, dans le cadre du suivi du bien-être des animaux, une surveillance quotidienne de (i) leur poids, ii) leur dynamisme, iii) la présence d'une voussure, et iv) l'altération du pelage sera effectuée. Si un signe de douleur intense ou de détresse (animal recroquevillé à l'écart des autres, changement dans la posture avec réticence à se déplacer, refus de se faire manipuler, grattage intense, morsures répétées, léthargie, couinements, absence de toilettage), ou un refus de s'alimenter avec une perte de poids de 20% sur 3 jours est observé, l'animal sera mis à mort. (Raffinement)

16555 La cardiomyopathie hypertrophique (CMH) est une maladie cardiaque caractérisée par une anomalie de la structure (hypertrophie, épaississement) du ventricule gauche du cœur, qui provoque un dysfonctionnement de la fonction cardiaque. Cette maladie constitue l'une des causes principales de mort subite du sujet jeune, notamment chez les sportifs de moins de 35 ans. Moins connues mais pourtant tout aussi tragiques, il existe également des formes néonatales, où une crise cardiaque et la mort des patients peut être observée avant l'âge de un an. La CMH est la pathologie cardiaque héréditaire la plus fréquente, touchant une personne sur 500. Elle est transmise de façon autosomique dominante. Parmi les gènes causant cette maladie, et notamment au stade néonatal, on trouve le gène MYBPC3, qui code pour la protéine C liant la myosine cardiaque.

La thérapie génique est une des approches thérapeutiques envisageables pour le traitement de cette pathologie. L'efficacité thérapeutique de la thérapie génique envisagée ici passe par le transfert dans le cœur, à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr), d'un gène thérapeutique qui est une copie du gène MYBPC3 humain, capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine MYBPC3 fonctionnelle. Une telle thérapie génique a donné de bons résultats dans le modèle murin de la maladie, ouvrant la voie à un essai clinique chez les patients atteints de CMH. Cependant, ces données de preuve de concept ont été générées en utilisant une copie du gène de souris, alors que le produit clinique prévu sera porteur du gène MYBPC3 humain, qui n'a jamais été testé chez l'animal. Or, avant le passage chez l'homme, un certain nombre d'études précliniques sont nécessaires avec ce produit AAV-MYBPC3 humain, notamment une étude de toxicologie réglementaire qui sera réalisée chez le rat Sprague Dawley sain.

L'objectif de cette étude est de mener une étude pilote chez le rat Sprague Dawley sain afin d'évaluer l'efficacité et la potentielle immunogénicité/toxicité du vecteur AAV-MYBPC3 humain dans cette espèce, et aider au design de l'étude de toxicologie réglementaire.

Un maximum de 56 rats (42 + 14 animaux de remplacement) si nécessaire sera inclus dans cette étude afin de tester l'effet de 3 doses différentes du vecteur AAV-MYBPC3 humain, à deux temps différents. Les animaux seront injectés par voie systémique (intrapéritonéale) au stade néonatal (1 à 4 jours d'âge). Les animaux seront ensuite suivis soit 1 mois, soit 4 mois post-injection avant d'être sacrifiés, afin d'étudier l'efficacité de transfert de gène dans le cœur et les autres organes majeurs. L'éventuelle toxicité du transfert de gène sur la fonction cardiaque sera évalué par des examens électrocardiographiques et échocardiographiques 2D des animaux. Des prélèvements sanguins seront également réalisés au cours de l'étude afin d'évaluer les paramètres sanguins des animaux (biochimie et numération formule sanguine) et d'étudier les réponses immunes humorale et cellulaire contre le vecteur thérapeutique.

Dans le respect de la règle des 3R, nous REDUIRONS le nombre d'animaux à maximum 6 rats par groupe (3 mâles et 3 femelles x 7 groupes, soit 42 animaux + 2 animaux de remplacement par groupe si nécessaire, soit un maximum de 42 + 14 = 56 animaux inclus). Ce nombre 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 pour une mesure d'efficacité du transfert du gène et d'immunogénicité, sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Cette étude étant une étude pilote, elle n'est pas vouée à réaliser des études statistiques, mais plus à affiner le plan d'étude d'une future étude de toxicologie réglementaire. Cependant, quand elle s'avèrera pertinente (peu de dispersion des données au sein d'un groupe expérimental), une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal- Wallis.

Nous RAFFINERONS cette étude par un hébergement des animaux selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu:

- 1) de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu (mise à disposition de tunnels en cartons ou PVC, frisottis de papier, bûchettes de bois et hébergement à deux animaux dès que possible).
- 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 en annexe de la saisine).
- 5) la mise en place de mesures adaptées en fonction des procédures expérimentales (anesthésie et analgésie si nécessaire).

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 mode d'administration utilisé et la dose administrée.

16556 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 30% de la mortalité mondiale totale. L'ischémie du myocarde est une pathologie cardiovasculaire très répandue qui est à l'origine de dysfonctions vasculaire et cardiaque (arythmies et infarctus du myocarde).

L'infarctus du myocarde touche 120 000 personnes par an en France et provoque le décès de 50 millions d'Hommes chaque année dans le monde. Cette pathologie qui survient à la suite de l'obstruction d'une artère coronaire privant ainsi une partie du myocarde d'oxygène, entraîne à long terme une dysfonction du ventricule gauche du cœur qui aboutit à l'instauration de l'insuffisance cardiaque. La fatigue, les difficultés respiratoires et la dysfonction ventriculaire qui en résultent, sont encore mal prises en charge par les traitements actuels et nécessitent donc la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques.

Cette situation clinique peut être étudiée au laboratoire grâce à des modèles précliniques chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. La sténose coronaire permanente ou transitoire (obstruction de l'artère coronaire) induite par chirurgie chez le rongeur constitue un modèle expérimental pertinent pour l'étude de l'infarctus du myocarde *in vivo* mais également du développement de l'insuffisance cardiaque consécutive.

La chirurgie nécessaire à la sténose coronaire et à l'induction de l'infarctus est réalisée sous anesthésie et est couverte par une analgésie. La fonction cardiaque et l'évolution de l'insuffisance cardiaque sont ensuite suivies entre autres par des méthodes non invasives et indolores, comme l'échocardiographie réalisée sous anesthésie gazeuse afin de limiter le stress de l'animal.

Ces examens visent à évaluer finement les effets d'un candidat médicament via un suivi longitudinal (dans le temps) par individu et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés.

Ces modèles d'insuffisance cardiaque vont également être pour certains destinés à des analyses *in vitro* après prélèvement des organes d'intérêt pour des évaluations histologiques, biochimiques, électrophysiologiques, etc...

Chez l'Homme l'insuffisance cardiaque peut être aggravée par différents facteurs de risques dits de comorbidités tels que l'hypertension, le diabète ou encore l'obésité. Différentes souches de souris (transgéniques ou non) présentant spontanément un ou plusieurs de ces facteurs de risques sont disponibles et peuvent ainsi être utilisées pour développer ce modèle, selon les besoins de recherche, afin de reproduire au plus juste les contextes d'insuffisances cardiaques retrouvés chez les patients. Ces études sont susceptibles de s'inscrire à 2 étapes de nos projets de recherche, d'une part dans une étape précoce afin de mieux comprendre l'impact de la délétion ou de la surexpression de certains gènes sur l'aggravation ou l'amélioration de la pathologie induite après une ischémie, et d'autre part en fin de processus de recherche de nouveaux candidats médicaments. A savoir que seuls les candidats médicaments préalablement sélectionnés pour leur efficacité sur des tests *in vitro* et dont la pharmacosécurité chez la souris est avérée, seront étudiés dans ce projet.

Pour le respect de la règle des 3R, nous avons prévu :

Pour raffiner : - Le handling dès l'arrivage des animaux ou pendant les 5 jours pré-chirurgie permet de prévenir le stress de l'animal lors des soins post chirurgie et des phases de mesure (échographie)

- Un suivi quotidien renforcé, via une grille individuelle de suivi spécifique au modèle, est assuré par les zootechniciens et les techniciens, en coordination avec la Structure de Bien-Etre Animal (SBEA) et le vétérinaire, permet de lever rapidement les alertes et prendre des décisions pertinentes pour limiter toute souffrance animale (anesthésie, analgésie et soins post opératoires, points limites)

- Un enrichissement de milieu est apporté aux souris leur permettant d'exprimer leur instinct de nidification et d'exploration.

- De la nourriture gélifiée facile à consommer est donnée en habitude et en post chirurgie

- Les évaluations par échographie sont non invasives et permettent d'évaluer facilement l'avancement de la pathologie chez l'animal anesthésié de façon ponctuelle sans incidence de stress ou de souffrance.

Pour remplacer : L'insuffisance cardiaque survient à la suite d'un infarctus du myocarde et se caractérise par un remodelage anatomique du cœur et une incapacité de celui-ci à assurer des débits sanguins suffisants. L'insuffisance cardiaque est une cause majeure de mortalité et sa prévalence est en constante augmentation.

La compréhension des mécanismes au départ adaptatifs puis délétères, ainsi que la validation de nouveaux traitements, passent par un recours à des modèles d'insuffisance cardiaque *in vivo*. Il n'existe pas de méthode alternative (type *in vitro*) pour reproduire l'ensemble des conditions permettant de conduire à un remodelage cardiaque tout en ayant la possibilité de 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 a été déterminé au plus juste par notre service biostatistique avec l'aide de nos données historiques.

Pour les études *in vivo*, nous prévoyons 6 études par an avec 114 animaux /étude (transgéniques ou non) ainsi nous envisageons d'utiliser 3420 souris/ 5 ans (nombre de souris nécessaire et suffisant afin d'avoir une significativité sur notre critère principal).

Pour les études dédiées aux analyses *in vitro*, nous prévoyons 4 études par an avec 46 animaux (transgéniques ou non), ainsi le nombre d'animaux s'élève à 184 animaux/ an soit 920 souris sur 5 ans. En ajoutant les deux types d'études sur 5 ans ce projet prévoit l'utilisation de 4340 souris.

16557 Le gavage est l'étape ultime dans la filière de production des canards gras. Après une longue période d'élevage en ferme sans contrainte d'espace et d'alimentation, le canard est soumis à un régime alimentaire spécial dans un espace réduit pendant une douzaine de jours pour développer le foie. Dans les conditions actuelles de production, la conduite des lots de canards est plutôt uniforme avec des protocoles alimentaires standards qui ne tiennent pas compte des différents états physiologiques des individus. Ceci entraîne une grande variabilité de comportement et de santé des animaux, ainsi que de qualité des carcasses et des foies. L'objectif du projet est donc de développer un système de pilotage de précision du gavage des canards pour une meilleure maîtrise du bien-être animal et de la qualité des produits. Ce nouveau système permettrait ainsi :

- 1) Le suivi et contrôle du bien-être et du poids du foie des canards par des indicateurs physiologiques au cours du gavage.
- 2) L'adaptation des doses alimentaires à chaque canard en tenant compte de son état de bien-être et du grossissement de son foie, pour éviter les poids supérieurs à l'objectif de qualité visé.
- 3) Une meilleure régulation de l'ambiance intérieure du bâtiment pour maintenir des conditions atmosphériques favorables au bien-être des animaux en toute saison.

Les essais seront réalisés sur des canards Mulard mâles, car ils représentent 98% de la production actuelle de foie gras. Ainsi, 2560 canards seront élevés pendant 81 jours en plein air avant d'être gavés 12 jours en intérieur. Quatre essais seront mis en place, impliquant chacun 640 canards, sur les quatre saisons d'une année, afin de tester l'impact des conditions météorologiques sur la régulation de l'ambiance interne du bâtiment, ainsi que sur l'état physiologique des animaux (objectif 3). En effet, des études ont déjà montré l'impact délétère de fortes températures notamment sur les paramètres respiratoires et sanguins des volailles d'élevage. Ainsi, pour déterminer les conditions d'ambiance optimales pour les animaux (température, humidité), il faut mettre en œuvre des conditions réelles de gavage intensif dans un bâtiment avec un effectif maximal en animaux. La salle de gavage sera équipée de capteurs pour mesurer l'ambiance en périodes chaude l'été, froide l'hiver, mais aussi au printemps et à l'automne, quand les écarts de températures diurne et nocturne sont importants. Le bâtiment utilisé est un modèle réduit des standards utilisés en élevage (1000 places en moyenne), ce qui nous permet de réduire le nombre d'animaux dans le cadre des essais. En outre, la salle sera physiquement séparée en deux pour tester l'impact de deux systèmes de ventilation sur la physiologie des animaux. Les quatre essais saisonniers permettront d'obtenir une base de données représentative et suffisamment

puissante pour réaliser des études statistiques et définir les meilleurs protocoles de régulation d'ambiance.

Afin de suivre l'état physiologique des animaux au cours du gavage (objectif 1), des mesures de température, d'activité et du poids de foie seront réalisées sur les animaux. La mesure de température sera réalisée sur chaque canard au moment du gavage, par un système de prise de température à distance. L'activité sera monitorée en continu sur 62 canards de manière non invasive et les résultats seront analysés sous la lumière d'une étude comportementale récente faisant le lien entre le bien-être des canards en gavage et leurs comportements. Pour ce faire, les animaux seront séparés en deux groupes : ceux présentant des comportements en lien avec du bien-être et ceux avec du mal-être (plumage très humide, animaux sales qui halètent régulièrement, etc.). Les mesures réalisées en continu sur les 62 canards nous permettront de visualiser suffisamment de mouvements pour faire le lien avec les signaux enregistrés par le dispositif. Le poids du foie sera suivi de manière non invasive, grâce à un dispositif de mesure fixé sur les animaux qui ne procure ni gêne ni douleur. Afin de ne pas interférer avec le suivi de l'activité, les mesures seront réalisées sur 33 autres canards.

Ce projet nécessite des animaux vivants, car, à ce jour, il n'existe pas de modèle biologique alternatif permettant de prédire l'évolution du poids du foie, des paramètres physiologiques et du comportement des canards. Grâce à du personnel formé à la manipulation de ces canards particulièrement nerveux, ainsi qu'à l'expertise des partenaires du projet, un soin particulier sera apporté afin de minimiser les gênes et risques occasionnés par la manipulation des animaux et la pose des dispositifs de mesures. En effet, ces animaux nécessitent une gestuelle précise non enseignée dans les formations à l'expérimentation animale. De même, toutes lésions ou blessures constatées amèneront au retrait immédiat du dispositif de l'animal. Afin de mieux suivre l'état physiologique des animaux, des prises de sang et des mesures de taux d'oxygène et de CO₂ seront réalisées par une vétérinaire tout au long des essais.

A la fin de chaque essai, tous les canards seront abattus afin d'obtenir des informations sur le poids et les anomalies de carcasse et du foie. Les animaux suivis par le dispositif de mesures seront abattus sur le site expérimental dans un bâtiment agréé indépendant, afin de réaliser des dissections anatomiques impossibles à réaliser en abattoir industriel. Si des altérations anormales sont constatées, comme des gênes dans le comportement, les dispositifs et protocoles de mesure seront révisés pour l'essai suivant. Les animaux non abattus sur site, seront envoyés dans un abattoir industriel pour une valorisation commerciale normale.

A terme, une offre de services et d'équipements sera proposée aux éleveurs des filières palmipèdes gras pour qu'ils puissent améliorer leur système de production. Dans d'autres lots de travail, les partenaires du projet développent une plateforme numérique pour la collecte des données et le calcul des doses alimentaires adaptées à chaque canard selon son poids de foie et son état physiologique relatif au bien-être (objectif 2).

16558 Les nouveau-nés prématurés ont une fonction respiratoire limitée. Afin d'assurer l'apport en oxygène nécessaire à ces nouveaux nés, ils sont systématiquement exposés à une atmosphère très enrichie en oxygène. Cette exposition est impliquée dans l'apparition de la dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) chez le nouveau-né prématuré entraînant une fonction respiratoire basse au début de l'âge adulte qui peut évoluer vers un handicap respiratoire sévère. La DBP est marquée par une altération des cellules de soutien (fibroblastes) qui entourent la principale cellule souche du poumon, le pneumocyte de type 2 (PII). L'altération des cellules de soutien peut être liée à l'activation d'inhibiteurs de la division cellulaire (comme p16ink4a) qui possède également un rôle dans le métabolisme des lipides.

Les premiers résultats de notre équipe montrent que :

- lors de la DBP, il existe une augmentation des cellules exprimant p16ink4a dans le sang.
- les souris atteintes de DBP, suite à une exposition à une atmosphère enrichie en oxygène, montrent une réduction du nombre d'alvéoles pulmonaires et par conséquent une perte de la capacité respiratoire. L'élimination du gène p16ink4a chez ces souris limite les effets néfastes de la DBP à l'âge adulte, cela est associée à une augmentation du nombre de fibroblastes riches en lipides du fait de la surexpression d'un gène qui joue un rôle dans le métabolisme lipidique : le gène SREBP.

D'après ces résultats, nous supposons que les fibroblastes transmettent aux PII les lipides nécessaires à la synthèse du surfactant et des membranes cellulaires permettant la formation des alvéoles. Nous exposerons des souris à une atmosphère enrichie en oxygène à hauteur de 85% (hyperoxie) pour provoquer une DBP. Nous testerons dans un premier temps la possibilité de fabrication d'organoïdes (organes pulmonaires rudimentaires) en cultivant deux types de cellules ensemble, les fibroblastes et les PII. Dans un deuxième temps, à partir de souris génétiquement modifiées pour les gènes p16ink4a ou SREBP, nous étudierons les mécanismes de la régénération des alvéoles et finalement la réparation des poumons malades dans ce modèle par rapport à des souris contrôles.

Pour cette étude, un effectif de 456 souris est nécessaire sur 5 ans. Quatre types de souris génétiquement modifiées seront utilisés pour le projet. Les souriceaux produits et leurs contrôles seront exposés pendant 2 semaines soit à l'air ambiant, soit à de l'air enrichi en oxygène (modèle d'hyperoxie). Les animaux seront mis à mort à J14, J16, J60 ou J120 de vie pour étude des modifications fonctionnelles et cellulaires. Le nombre de souris et de groupes expérimentaux ont été limités au strict nécessaire. Le modèle d'hyperoxie chez la souris est un modèle reconnu pour comprendre les lésions de DBP car la période d'alvéolisation pulmonaire (formation des alvéoles), se déroulant in utero chez l'homme, prend place après la naissance chez la souris. Ce modèle est le seul qui permet d'induire des lésions de DBP proche de celle observées chez l'homme sans avoir recours aux autres modèles de DBP par agression chimique ou mécanique (ventilation) étant plus agressif et moins physiologique. Les souris seront hébergées dans des portoirs ventilés avec un environnement enrichi. Les souris auront à leur disposition de la boisson et de la nourriture, des huttes en carton, des balles de coton, des feuilles de papier pour jouer et des baguettes de bois à ronger.

16559 Les maladies allergiques affectent 30 à 40% de la population mondiale, et l'augmentation globale de leur prévalence en font à ce jour un enjeu de santé public. Les allergies alimentaires (AA) représentent 5,9% de la population et elles sont souvent associées à des allergies cutanées comme la dermatite atopique (DA). Les réactions dues aux AA peuvent être systémiques et engendrer des chocs anaphylactiques. Elles sont détectables jeunes et peuvent perdurer chez l'adulte. Le rôle précoce d'une anomalie de diversité du microbiote a été récemment mis en évidence ainsi qu'un dysfonctionnement au niveau des barrières épithéliales intestinales et du système immunitaire. L'origine du développement des AA est multifactorielle (facteurs génétiques, mode de vie, environnement extérieur, etc...) et dépend notamment du régime alimentaire devenu pauvre en fibres. Toutefois, il n'existe aucune stratégie validée pour prévenir du développement de l'AA chez l'enfant. Or, la grossesse représente une fenêtre d'intervention optimale dans la régulation du processus allergique à travers une modulation des systèmes immunitaire et microbien du fœtus, ce qui en fait une piste prometteuse pour la prévention de l'AA. En effet, notre étude préclinique a montré chez la souris une diminution de l'AA après une exposition aux prébiotiques durant la gestation et l'allaitement.

L'objectif de ce projet sur 5 ans est de comprendre les mécanismes de l'effet préventif des prébiotiques sur l'AA dans un modèle murin afin de nous permettre d'appréhender la mécanistique de l'essai clinique randomisé multicentrique PREGRALL chez l'Homme dont le but est de déterminer l'efficacité d'une supplémentation anténatale maternelle en prébiotiques sur l'occurrence de la dermatite atopique associée ou non à l'AA (l'étude PREGRALL est financée par le PHRC-I 2015 et a démarré en février 2018). Dans cette étude, toutes les mères participantes sont allergiques.

Pour mimer l'étude clinique PREGRALL nous utiliserons des souris femelles reproductrices allergiques. Pour cela, elles seront rendues allergiques par des injections intrapéritonéales avec des gliadines de blé. Elles seront nourries avant et pendant la gestation avec un régime standard ou enrichi en prébiotiques GOS/Inuline ou enrichi en HMO (Safe, France).

Toutes les mères seront ensuite maintenues sous régime standard pendant la période d'allaitement des souriceaux. Après sevrage des souriceaux, les mères des trois groupes seront sacrifiées.

Ensuite, les souriceaux à 4 semaines de vie seront soumis au protocole de sensibilisation par injection intrapéritonéale aux gliadines de blé ou au PBS pour les contrôles pour mimer l'AA à l'instar d'études antérieures. Pour cela, la moitié des souriceaux de chaque groupe sera sensibilisée par une première

injection à 4 semaines de vie puis par une deuxième injection 10 jours après la première injection. Elles seront ensuite exposées oralement 7 jours après avec ce même allergène puis sacrifiées.

Lors du protocole le sang, les selles et le lait seront prélevés chez les mères ainsi que le sang et les selles chez les souriceaux. Puis, au terme de 18 semaines de protocole, les souris seront sacrifiées pour prélever les organes et réaliser les analyses.

Au cours de ces 5 ans de protocole, l'effet préventif d'une supplémentation anténatale en prébiotiques sur l'occurrence de l'AA sur la descendance sera évalué. Nous analyserons dans notre modèle les réponses cliniques, la physiologie des barrières (intestin : jéjunum et colon proximal), le système immunitaire, la composition du lait, le sérum maternel, le sang ainsi que les selles.

Ainsi, ce projet nous permettra d'acquérir de nouvelles connaissances sur ces biomarqueurs préventifs de l'AA. En transposant les résultats attendus du modèle animal à l'Homme, cette étude sera également l'opportunité d'élucider les mécanismes d'une prévention précoce des allergies par une intervention nutritionnelle durant la période anténatale.

Le principe des 4R sera appliqué afin de réduire (estimation d'un nombre minimum de souriceaux à analyser en fin de protocole pour être statistiquement robuste, notre expérience en reproduction animale nous permet de réduire au minimum nécessaire le nombre de couple reproducteur ; les organes non utilisés des souris contrôles pourront être utilisés pour la mise au point d'autres protocoles), remplacer (la caractérisation des mécanismes biologiques se fera *in vitro* autant que possible), raffiner (hébergement adéquat, 2 enrichissements du milieu, utilisateurs expérimentés, respect de la période d'adaptation, réduction du stress des animaux, utilisation d'anesthésique pour chaque geste invasif, utilisation de tapis chauffant pour les prélèvements de lait et réveil après anesthésie) et responsabiliser le personnel sur l'utilisation de l'expérimentation animale en leur faisant suivre des formations d'éthique et d'expérimentation animale avec suivi de compétences. Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes *in vitro* ou *in silico*. Les modèles animaux d'AA (au blé) ont été soigneusement conçus et évalués pour fournir des informations pertinentes pour l'application future à l'Homme. De plus, ces modèles étant bien établis, ils possèdent l'avantage de permettre de réduire au maximum le nombre d'animaux du fait de la connaissance et la précision des paramètres observés.

Pour évaluer l'impact du prébiotique chez la descendance les paramètres cliniques classiques de l'AA seront étudiés ainsi que la physiologie des barrières (intestin), le microbiote et composition du sérum (Immunoglobulines, histamine, mMCP1). Les paramètres immuns seront étudiés également par l'analyse des populations cellulaires immunitaires innées et adaptatives au niveau de l'intestin et au niveau systémique (rate et sang). La composition du lait maternel (microbiote, nutriments, lipides et oligosaccharides) sera étudiée.

Nous utiliserons 525 souris reproductrices dont 270 femelles reproductrices et 135 mâles reproducteurs divisées en 3 groupes : un groupe contrôle (90 femelles + 45 mâles), un groupe prébiotiques GOS/Inuline (90 femelles + 45 mâles) et un groupe prébiotiques HMO (90 femelles + 45 mâles). Dans ces conditions nous espérons obtenir au moins 120 souriceaux femelles en tout.

Le nombre important de souris est expliqué par la difficulté des prélèvements à effectuer ainsi que la quantité de tissu et de cellule très faible. L'analyse demande également de séquencer les manipulations pour veiller au bien être des souris et au bon déroulement des expérimentations scientifiques. Les animaux seront logés dans un environnement avec une humidité relative, une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement.

16560 Le réseau des ganglions de la base (GB) organise le fonctionnement d'un ensemble de structures cérébrales ayant un rôle crucial dans le contrôle de nos actions motrices quotidiennes. Les modes de fonctionnement exacts de ce circuit pendant un mouvement restent encore méconnus à ce jour. Le dysfonctionnement de ce réseau entraîne des maladies motrices graves qui affectent non seulement la capacité d'initier une action (maladie de Parkinson) ou à l'inverse l'impossibilité de réprimer des mouvements involontaires (dyskinésies). L'objectif principal de ce projet de recherche est de disséquer le rôle des GB à la fois dans l'exécution d'un mouvement normal et dans la genèse des mouvements

anormaux. Nous étudierons deux situations pathologiques extrêmes : i) la maladie de Parkinson et ii) l'état dyskinétique. Le projet bénéficiera d'une avancée technologique consistant à manipuler de façon contrôlée, temporaire et réversible à l'aide d'une lumière laser l'activité électrique de populations de neurones ciblés afin d'en définir leurs rôles.

Les GB étant composés de nombreuses sous-populations neuronales, l'objectif principal du projet de recherche est de comprendre l'implication fonctionnelle de chacune d'entre-elles en s'appuyant sur l'utilisation de souris transgéniques. Les souris transgéniques qui seront utilisées permettront de cibler précisément les différentes sous-populations neuronales des GB, inaccessibles chez des animaux non modifiés génétiquement. Ces animaux seront utilisés en condition non pathologique et en condition pathologique reproduisant la maladie de Parkinson chez le rongeur avec ou sans induction de mouvements involontaires. Les expériences planifiées sur ces animaux sont basées sur une approche pluridisciplinaire qui combine manipulations par la lumière laser des neurones et enregistrement de l'activité électrique des neurones *in vivo* en situation comportementale. La tâche motrice que nous utiliserons consiste en un mouvement volontaire de type appui sur un levier et/ou de locomotion spontanée et sur tapis roulant.

L'organisation du projet ainsi que l'ensemble des protocoles expérimentaux s'inscrivent dans le strict respect des fondements éthiques dictés par la règle des 3 'R' (Réduire, Raffiner, et Remplacer). À ce jour, l'obtention de telles données ne peut se soustraire à l'utilisation de modèles animaux, qui ne peuvent pas encore être remplacés par des modèles alternatifs (modélisation, culture cellulaire, coupes de cerveau). L'identification des circuits neuronaux impliqués dans l'acte moteur volontaire requiert la manipulation et l'enregistrement intracérébral des réseaux neuronaux chez l'animal vigile qui ne peuvent pas encore être obtenus à partir de méthodes alternatives. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux a été fixé à 75 individus par groupe expérimental afin d'atteindre la puissance statistique nécessaire et suffisante à la réalisation de ce type d'expérience (en fonction des effets attendus et de la variance de notre échantillonnage). Comme nous souhaitons reproduire ces résultats quel que soit le sexe de l'animal (i.e. mâle et femelle) nous atteindrons 150 animaux par groupe expérimental. Considérant toutes les différentes lignées de souris, le nombre total de souris utilisées pour la réalisation de ce projet de recherche est de 3900. Finalement, l'ensemble du projet repose sur des critères de raffinement strict. Les expérimentateurs ont tous été formés spécifiquement à la réalisation de ce type de projet et porteront une attention particulière au respect des procédures.

Ces dernières ont été établies afin de (1) limiter la douleur et la traiter si elle ne peut être évitée (utilisation d'anesthésiques et/ou d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure) et 2) prévenir et soulager le stress des animaux en assurant les meilleures conditions de vie aux animaux tout au long du projet. Le bien-être des animaux est notamment assuré par le maintien des conditions de vie en groupes sociaux dans un environnement additionné d'éléments d'enrichissement du milieu. Pour la partie comportementale, les animaux sont manipulés quotidiennement et habitués à la fois aux expérimentateurs et aux dispositifs expérimentaux pour diminuer leur niveau de stress. Les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne, particulièrement renforcée après chirurgie, ou dès que nécessaire. Des points limites précoces ont à ce titre été clairement définis à l'aide d'une grille d'évaluation afin d'identifier précocement toute forme de souffrance et de les prendre en charge rapidement avec des mesures de soulagement adaptées.

16561 Le parasitisme gastro-intestinal est l'une des contraintes pathologiques majeures des petits ruminants au pâturage, sous toutes les latitudes. Chez les caprins, il diminue la productivité laitière des chèvres, ralentit la croissance des chevreaux en allaitement et induit une mortalité et une morbidité importante pré- et post-sevrage. Le présent programme de recherche a été motivé par la nécessité de repenser la lutte contre ces parasitoses, jusqu'ici basée sur les traitements anthelminthiques. La résistance génétique aux nématodes gastro-intestinaux (NGI) a été très étudiée en ovin sous toutes les latitudes. En revanche peu de résultats sont disponibles en caprin. Or, la chèvre est un modèle biologique original pour l'étude de ce caractère d'adaptation. La coévolution entre la chèvre et les NGI a été brève comparativement à l'ovin. Ses mécanismes de résistance sont donc probablement plus primaires que chez le mouton chez qui ils ont eu le temps de se complexifier. Par ailleurs, la chèvre Créole du fait de

son métissage et de la sélection naturelle à laquelle elle a été soumise, serait porteuse d'allèles favorables à son maintien dans un milieu à fortes contraintes.

Le projet a été décliné en 3 volets :

1. Développer les outils pour introduire la résistance aux NGI dans un schéma d'amélioration génétique des caprins.
2. Identifier des marqueurs phénotypiques fins de la réponse immunitaire contre les NGI qui pourraient être utilisés dans le schéma d'amélioration génétique.
3. Dans un dernier volet, caractériser le lien entre le génotype (résistant vs sensible), le comportement et le niveau d'infestation au pâturage à l'aide de méthodes de suivi.

Ce programme repose sur un troupeau expérimental de caprins en production élevés au pâturage (n=12 boucs reproducteurs et 250 femelles reproductrices et 50% de leurs descendants) et deux troupeaux expérimentaux divergents (résistants et sensibles aux NGI, n=70 femelles reproductrices et leurs descendants) sélectionnés à partir du précédent et élevés également au pâturage. Les procédures expérimentales sont communes aux trois volets : suivi de l'excrétion d'œufs de parasites dans les fèces, suivi de la formule sanguine et de la production d'anticorps sériques et salivaires dirigés contre les parasites. Deux procédures sont spécifiques aux volets 2 et 3 respectivement : l'infestation expérimentale des chevreaux pour standardiser le nombre de larves infestantes ingérées par les animaux, et le suivi du comportement individuel des animaux au pâturage. Dans le volet 2, des abattages sont prévus pour des analyses histologiques, transcriptomiques, protéomiques sur tissus cibles (muqueuse intestinale et organes lymphoïdes).

Le premier volet s'appuie sur l'analyse de phénotypes synthétiques : l'excrétion d'œufs de parasites dans les fèces, la formule sanguine, la sérologie et des tests salivaires. Ces mesures permettront d'avancer dans la connaissance de nos caractères et de dégager des premières pistes de mécanismes. Par ailleurs, nos travaux récents soulignent l'importance de la dynamique de la réponse immunitaire contre les NGI pour l'expression de la résistance. Des gènes et réseaux de gènes associés au génotype résistant ont été identifiés à des périodes clés après l'infestation mais les mécanismes sous-jacents restent à caractériser. Des abattages d'animaux de génotypes résistant et sensible seront réalisés au cours de ces périodes clés pour des mesures fines. Enfin, les résultats apportés par le dernier volet vont permettre de quantifier l'ingestion de larves infestantes de NGI au pâturage et d'étudier les interactions avec le génotype mais également des paramètres comme l'âge, le statut social. Les troupeaux présents en routine sur l'exploitation seront utilisés en condition usuelle. Nous réaliserons également des suivis d'animaux à l'échelle individuelle avec des effectifs réduits (par lot de 4, avec 2 à 3 répétitions).

La règle des trois R a été prise en compte dans ce projet de la manière suivante. Concernant la Réduction et le Raffinement, pour la composante génétique quantitative, la principale variable mesurée qui présente une distribution de type négative binomiale (nombre d'éléments parasitaires fécaux), nécessite au moins une quinzaine d'animaux par cellule élémentaire (descendants/père), en tenant compte de l'effet saisonnier et de la variabilité des facteurs étudiés. Sur le deuxième volet, les analyses de données prévues pour l'identification des marqueurs phénotypiques nécessitent plus de variables explicatives que d'observations ce qui justifie la mesure de tous les phénotypes fins indiqués. Les manipulations des animaux lors des procédures expérimentales seront bienveillantes et réalisées par du personnel très expérimenté. La prise de sang à la veine jugulaire ne nécessite qu'une légère contention de l'animal entre les jambes de l'animalier. Dans cette position l'animal de bouge plus. Des rouleaux salivaires sont introduits dans la gueule des animaux à l'aide d'une pince entre la dentition et la joue. A la fin des prélèvements une poignée d'aliment concentré est offerte aux animaux.

Pour le dernier volet des répétitions sur des effectifs réduits (2 à 4 lots de 4 animaux/répétition pour un total de 15 répétitions) permettront d'accumuler le volume de données nécessaire sur un effectif réduit (entre 120 et 240 animaux sur la durée du projet). Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet sera de 1310. Le Remplacement n'est pas envisagé ici puisque d'une part les caprins sont les animaux qui sont infestés par ces parasites et, d'autre part l'objectif finalisé de ce projet est la mise en place d'un schéma d'amélioration génétique et la conception d'outils décision pour la gestion intégrée du parasitisme.

16562 Le mélanome est un cancer de la peau qui se développe à partir des mélanocytes, les cellules responsables de la pigmentation cutanée. Il s'agit de l'un des cancers les plus agressif en raison de sa capacité à former des métastases et donc de se répandre dans notre organisme et de part sa grande résistance à la plupart des traitements actuels (chimio- et radiothérapie).

Le système immunitaire a pour rôle de maintenir l'homéostasie et de détruire les éléments étrangers à notre corps, en particulier les cellules cancéreuses. Cependant, pour se développer et proliférer, les cellules cancéreuses sont capables d'altérer le fonctionnement normal des cellules immunitaires. Ainsi, il est reconnu que les cellules immunitaires localisées à proximité des tumeurs, donc dans leur environnement, échouent non seulement à générer une réponse anti-tumorale efficace, mais interagissent également avec les cellules malades pour favoriser l'expansion et l'invasion des tumeurs.

Ces dernières années, la prise en charge du mélanome a largement bénéficié du développement d'une nouvelle classe de traitement, l'immunothérapie, dont l'objectif est de pousser les cellules immunitaires à s'attaquer aux cellules cancéreuses. Néanmoins, tous les patients ne répondent pas de manière équivalente à ces traitements et des recherches sont nécessaires pour pouvoir mieux prédire la réponse au traitement ou pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

La lymphopoiétine stromale thymique (TSLP) est une molécule produite par différentes cellules, dont celles qui composent la peau appelées kératinocytes. De récentes études suggèrent que TSLP a un rôle dans le développement et la croissance de certains cancers en modifiant le fonctionnement normal du système immunitaire. Des recherches préliminaires réalisées par notre laboratoire ont montré que les kératinocytes produisaient plus de TSLP dans le mélanome. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la production de TSLP par les kératinocytes pourrait jouer un rôle important dans la progression et la métastase de la tumeur en perturbant la réponse immunitaire.

L'objectif de ce projet est d'approfondir les connaissances des modalités d'interaction entre les cellules cancéreuses, les kératinocytes et les cellules immunitaires. Nous chercherons notamment à comprendre de quelle manière les kératinocytes, via TSLP, permettent au mélanome d'échapper au système immunitaire et quelles sont les cellules immunitaires et molécules impliquées dans ces interactions. En effet, une meilleure compréhension de ces mécanismes nous permettra de trouver de nouvelles stratégies pour reprogrammer l'immunité et trouver de nouveaux marqueurs qui caractérisent le mélanome.

Pour répondre à nos questions, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées : des souris ayant les mêmes mutations que celles trouvées chez l'Homme et/ou qui n'ont pas la molécule d'intérêt pour pouvoir en étudier son rôle sur la croissance des tumeurs et métastases. Nous utiliserons également des souris qui présentent des absences de certaines cellules immunitaires pour déterminer leur rôle.

Remplacement : Les lignées de souris génétiquement modifiées utilisées dans ce projet vont nous permettre d'étudier des gènes ou cellules dont l'implication dans le mélanome a été suggéré *in vitro* par notre laboratoire ainsi que d'autres. Les phénomènes à l'œuvre dans le mélanome cutané mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires qui composent l'ensemble du microenvironnement tumoral. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour comprendre ce phénomène et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction : Afin de différencier les rôles de différentes molécules pouvant être impliquées dans le développement du mélanome, l'ensemble du projet va nécessiter l'utilisation de 13 lignées de souris différentes et d'un maximum de 709 animaux (minimum de 451 animaux, en fonction des résultats). Ce nombre d'animaux nous permettra d'obtenir des conclusions statistiquement significatives. Par ailleurs, des études préliminaires *in vitro* ont été réalisées afin d'éliminer certaines hypothèses et de mieux définir les expériences à effectuer sur les modèles *in vivo*.

Raffinement : Pour l'ensemble des animaux, la surveillance sera visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, sa posture et son comportement. Si l'animal présente un dos vouté, un pelage hérissé, est inactif après stimulation, ou si les points d'injections présentent des signes d'infection ou d'inflammation il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement. Pour les souris développant des tumeurs cutanées, un suivi particulièrement attentif des animaux sera effectué chaque jour. Le diamètre des tumeurs sera mesuré avec un pied à coulisse et les animaux seront

euthanasiés si la tumeur atteint 1 cm³. Les procédures expérimentales susceptibles d'entraîner une souffrance ou une angoisse pour l'animal sont réalisées sous anesthésie.

16563 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. Les cellules de l'épithélium intestinal, y compris les CEE, sont continuellement renouvelées (tous les 3-4 jours chez l'Homme). Malgré leur grande diversité, les cellules endocrines sont toutes issues de cellules dites progénitrices qui expriment un gène spécifique commun (gène d'intérêt). L'absence d'expression de ce gène dans l'intestin 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 néonatale de 50% des individus chez le modèle murin.

Dans ce projet pilote, nous souhaitons évaluer la présence d'un phénotype dommageable chez des animaux où le gène d'intérêt a été inactivé de manière constitutive (depuis la conception) dans l'intestin. En fonction de la sévérité du phénotype établi par cette étude, ces animaux seront utilisés dans un futur projet afin d'étudier l'impact de la perte des CEE sur le métabolisme énergétique. Nous souhaitons comparer ces futures données avec celles obtenues précédemment chez un modèle murin où l'inactivation du même gène d'intérêt a été induite chez l'adulte suite à l'administration d'une molécule (le tamoxifène).

Dans ce projet (établi pour une période de 5 ans), nous utiliserons 60 animaux, ce qui correspond à 4 lots de 15 animaux, incluant un lot contrôle et un lot mutant et des lots de mâles et de femelles pour tenir compte d'éventuelles différences liées au sexe.

Remplacement : Ces analyses visent à définir si la mutation induit un phénotype dommageable ou non. Par conséquent, des animaux sont nécessaires afin d'évaluer l'impact de la mutation sur la survie et le bien-être des animaux.

Raffinement : L'élevage des animaux sera réalisé par un personnel compétent respectant l'ensemble des règles relatives au bien-être animal et averti de la possibilité de l'apparition d'un phénotype dommageable chez les mutants.

Une étude menée pour la même mutation mais dans un fond génétique différent a montré que ces animaux présentent des diarrhées dès la naissance pouvant entraîner l'affaiblissement, la déshydratation et la mort lors des premières semaines de vie. Ainsi, un suivi quotidien du comportement (déplacement, vivacité, posture) et de l'aspect des animaux (propreté) sera effectué afin de déceler au plus tôt les animaux souffrants.

En cas de souffrance d'un animal, l'avis du vétérinaire sera demandé et si jugé nécessaire l'animal sera réhydraté ou mis à mort.

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

16564 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 postnatal, 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, sans modéliser les anomalies squelettiques, n'entraînant aucun

phénotype dommageable à la souris. 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, sur ces souris modèles du SRT. Le principe actif de ce médicament est connu pour améliorer les processus moléculaires qu'une équipe a précédemment retrouvés 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 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 560.

Le présent projet se décompose en deux parties. Dans une première partie, nous souhaitons injecter directement le médicament dans la région cérébrale que nous aurons identifiée grâce au projet précédent (potentiellement l'hippocampe). Nous espérons ainsi identifier la région préférentiellement ciblée par ce médicament.

Dans une deuxième partie nous souhaitons manipuler l'activité de la région cérébrale en question en utilisant une technique permettant d'activer ou d'inhiber une région cérébrale ciblée. Cette technique, appelée optogénétique, nous permettra d'établir le rôle précis d'une région cérébrale dans les déficits observés. Par exemple, si les souris CBP-KO présentent des déficits cognitifs conséquents à un dysfonctionnement hippocampique, alors une manipulation optogénétique (activation ou inhibition) devrait rétablir ce déficit.

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 comportementaux, 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.

Concernant les procédures de chirurgies stéréotaxiques, nous appliquerons des mesures de raffinement adaptées afin d'éviter la douleur et le risque d'infection. Suite à l'anesthésie, l'animal reçoit une injection sous-cutanée d'un anti-inflammatoire non stéroïdien. Les effets de cette molécule, et en particulier l'effet antalgique, seront donc efficaces lors du réveil de l'animal. Du gel hydratant est également posé sur chaque oeil afin d'éviter tout dessèchement rétinien. La zone d'incision est

désinfectée à l'aide d'une solution de Bétadine. Ensuite, un anesthésique local est injecté en sous-cutané dans la zone à inciser. A la fin de l'opération, l'animal est placé dans une chambre chauffée à 36°C et est régulièrement surveillé jusqu'à son réveil puis est remis dans sa cage avec un peu de nourriture humide. Un suivi post-opératoire est effectué pendant 4 jours avec l'observation de la plaie. Par ailleurs, le lendemain les reçoit une injection d'un anti-inflammatoire non stéroïdien toutes les 12h le jour de l'opération et le lendemain.

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.

16565 Malgré l'existence d'un vaccin pour lutter contre le virus de l'hépatite B (Hepatitis B virus ; HBV), cette infection virale reste un problème majeur de santé publique mondiale. Le nombre de personnes atteintes par le virus de l'hépatite B est estimé à plus de 350 millions dans le monde. Ces personnes porteuses du virus sont un réservoir potentiel pour sa dissémination et présentent un fort risque de développer une cirrhose hépatique ou un hépatocarcinome (HCC).

Chez ces patients, la disparition des antigènes HBs (HBsAg) sériques signe l'élimination complète du virus ce qui permet l'arrêt du traitement, les risques de développement de complications hépatiques étant alors très faibles. Les traitements actuels (IFN alpha et analogues de nucléosides) parviennent à contenir l'infection mais la disparition complète des HBsAg n'est observée que chez 10% de la population traitée. De plus, le virus contenu sous forme d'ADN super-enroulé (cccDNA) dans le noyau des cellules hépatocytaires, contrôlé par le système immunitaire, peut se réactiver dans le cas d'une immunodépression (ex : traitement chimio-thérapeutique, infection VIH). C'est pourquoi il est important de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant l'élimination complète du virus.

A l'heure actuelle, les tests *in vitro*, effectués préalablement pour valider l'intérêt des cibles identifiées et l'efficacité de nouvelles molécules, ne permettent pas d'appréhender l'intégralité des mécanismes de l'infection et de l'interaction hôtes/pathogènes. C'est pourquoi, le recours à des modèles expérimentaux *in vivo* s'avère nécessaire pour la compréhension et l'évaluation des mécanismes d'actions des composés candidats. Ces modèles *in vivo* permettent également d'anticiper l'éventuelle toxicité des molécules thérapeutiques dans ces conditions complexes de relation hôte/pathogène (implication du système immunitaire).

Le virus HBV n'infecte que l'homme et quelques espèces animales. Cependant, des modèles souris plus simples peuvent être utilisés pour la recherche appliquée au HBV. Des modèles de souris transgéniques exprimant de façon constitutive le virus HB ou encore des souris présentant des foies humanisés et/ou un système immunitaire humanisé sont très utiles pour évaluer les infections au HBV et des thérapies mais restent complexes et coûteux à développer.

D'autres modèles intermédiaires sont présentés dans la littérature scientifique. Le modèle AAV/HBV décrit dans ce document permet de mimer l'infection au HBV et la persistance du virus *in vivo*. Ce modèle est considéré par la communauté scientifique comme très utile et complémentaire des modèles *in vitro* pour la recherche de nouvelles molécules anti-HBV. Enfin, le recours à l'animal permet d'étudier chez les animaux sains ou dans le contexte de l'infection, la bio-distribution des composés, leurs mécanismes d'action, l'évaluation de la production d'anticorps neutralisant le traitement (Anti-Drug Antibody), l'évaluation de l'induction de cytokines et de la réponse immunitaire afin de déterminer les doses et les schémas d'administration les plus adaptés.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce cadre représente 1500 rongeurs par an, soit 7500 rongeurs pour 5 ans, avec des modèles de classe légère, de durée allant de quelques heures à 24 semaines selon le protocole. Une observation quotidienne est réalisée pour tous les modèles, la fréquence de cette observation est adaptée 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 de tous les pays de destination des produits n'est développée à ce jour pour les procédures expérimentales décrites.

Réduction : Le schéma expérimental des procédures de ce projet s'appuie sur des données bibliographiques. Ces expériences feront 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 d'autorisation de mise sur le marché.

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, une anesthésie est pratiquée et des points limites sont mis en place dans les études pour limiter la souffrance des rongeurs.

16566 La dépression majeure affecte approximativement entre 8% et 12% des hommes et entre 15% et 20% des femmes. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de 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).

On pense actuellement que la dépression se manifeste chez le sujet adulte, mais que des symptômes existent dès l'adolescence. Le but de cette étude est de mettre en évidence des marqueurs neuronaux de la vulnérabilité aux troubles dépressifs à l'adolescence. Notre approche se basera sur un isolement social après sevrage des souris à l'adolescence (saisine 1/2). Les souris passeront dans un appareil d'imagerie scintigraphique pour étudier leur fonctionnement cérébral (saisine 2/2) et ensuite différents tests comportementaux seront réalisés pour évaluer leurs performances mnésiques, leur comportement anxieux et leur état hédonique.

Pour cette procédure TEP (Tomographie par Emission de Positons), 2 groupes de 12 souris c'est-à-dire 1 groupe isolé et un deuxième groupe non isolé soit un total de 24 souris seront soumis à cette procédure.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : Les différentes procédures seront réalisées sous anesthésie. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu.

Remplacement : aucune méthode alternative ni substitutive n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

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).

16567 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable chaque année d'environ 6 000 nouvelles contaminations en France. Les traitements actuels (trithérapies antivirales) permettent d'inhiber de manière efficace la multiplication du VIH et de diminuer la mortalité due à l'infection. Toutefois, le virus n'est pas éliminé de l'organisme et persiste dans des cellules dites « cellules réservoirs », impliquant un lourd traitement à vie. Pour envisager de nouveaux traitements, il est indispensable d'élucider les mécanismes de la réplication virale, ainsi que ceux permettant son inhibition.

Chez le primate non-humain, le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), l'équivalent du VIH chez l'être humain, peut provoquer une infection pathogène comparable à celle observée chez l'humain. Certaines espèces sont des hôtes naturels du SIV. Elles ne présentent aucun endommagement de leur système immunitaire malgré des infections chroniques : les lymphocytes T CD4 (cibles du virus) sont maintenus, les tissus lymphoïdes restent intacts et aucune inflammation chronique n'est observée. Il a récemment été démontré chez cette espèce « hôte naturel » que la réplication du SIV est contrôlée dans les cellules réservoirs, grâce à la mobilisation d'une population immunitaire de cellules tueuses naturelles (Natural killer, NK) et à leur accumulation au niveau des ganglions lymphatiques, un lieu de persistance privilégié du virus.

Dans cette étude, nous proposons d'identifier chez ce modèle les mécanismes spécifiques à l'origine de l'inhibition de la réplication virale médiée par ces cellules NK, au niveau des ganglions lymphatiques.

L'infection sera provoquée par un virus modifié, connu pour diminuer la capacité des cellules NK à tuer les cellules infectées *in vitro*. La réponse de l'organisme sera étudiée *in vivo*, par suivi des cellules NK et de la réplication virale dans les ganglions lymphatiques et au niveau sanguin. Nous étudierons également les interactions existant entre des récepteurs à la surface des cellules NK, le virus, et des récepteurs à la surface des cellules cibles.

Les résultats obtenus contribueront au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à réduire de manière significative le réservoir viral tissulaire, avec à terme l'objectif d'augmenter les chances de guérison après une infection par le VIH chez l'être humain.

Le projet prévoit le recours à un maximum de 14 primates non-humains, sur 5 ans, provenant d'élevages autorisés. Les tests *in vitro* ne peuvent pas refléter le comportement de la cellule dans son contexte physiologique, ni mimer les conditions de fonctionnement d'un organisme entier. C'est pourquoi les études *in vivo* sont nécessaires. L'utilisation de ce modèle se justifie par les similitudes anatomiques fortes avec l'humain, par les comportements similaires des virus SIV et VIH, ainsi que par leurs effets comparables sur les organismes. Le projet portant sur l'étude de la réponse immunitaire de l'organisme et la migration des cellules immunitaires, il est impossible de remplacer l'animal par tout autre modèle ne représentant que partiellement un organisme. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques permettant l'interprétation des résultats. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Les protocoles consisteront en des injections intraveineuses, des biopsies, ainsi que des ponctions veineuses avec limitation des volumes prélevés. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux, et incluent des protocoles d'anesthésie et l'analgésie. Une attention particulière sera apportée aux conditions d'hébergement en groupe. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie). Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du « bien-être animal » de l'établissement.

16568 Les myopathies centronucléaires (MCN) sont un groupe de maladies musculaires d'origine génétique provoquant un déconditionnement musculaire (perte de masse et de force musculaire) chez les individus atteints. La forme autosomale dominante (MCN-AD) 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.

La myostatine (Mstn) et l'activine A (ActA) sont des facteurs circulants dont les propriétés cataboliques et anti-anaboliques ont bien été décrites dans la littérature. Nos travaux antérieurs ont démontré l'efficacité d'une stratégie thérapeutique basée sur l'inactivation de la Mstn qui permet de retarder l'apparition des symptômes de la MCN-AD et de restaurer la fonction musculaire des souris myopathes. Ces travaux ont été menés chez des souris dont le gène de la myostatine a été inactivé par manipulation génétique (souris Knock-Out pour la Mstn). Afin de se rapprocher des conditions cliniques, nous souhaitons évaluer l'efficacité de l'injection d'une molécule jouant un rôle d'inhibiteur de la Mstn et de l'ActA endogènes. L'inhibition conjointe de ses molécules sera réalisée par injection intrapéritonéale d'une forme soluble du récepteur commun à la myostatine et à l'activine A : le récepteur ActRIIB. Des injections intrapéritonéales seront réalisées 2 fois par semaine pendant 4 semaines chez des souris âgées de 1 mois présentant peu de symptômes, et sur des souris âgées de 2 mois où le phénotype est totalement établi. Les souris traitées seront analysées en regard d'un groupe sauvage de même âge recevant le traitement ActRIIB, d'un groupe myopathe et d'un groupe sauvage recevant un placebo (solution neutre véhicule de l'ActRIIB). Le nombre d'animaux par groupe (10) a été réduit au maximum afin de réaliser une étude statistique solide malgré le risque de variabilité interindividuelle inhérent aux actions des molécules administrées. Au total 40 souris myopathes (2 âges 2 traitements) et 40 souris sauvages seront nécessaires à la réalisation du projet. Toutes les 2 semaines un prélèvement sanguin sera réalisé afin de contrôler les concentrations circulantes en myostatine et activine A. A l'issue des 4 semaines de traitement, les souris subiront une anesthésie chimique sans

réveil afin de réaliser une mesure de force au niveau du muscle tibial antérieur, de prélever des muscles de la patte postérieure et un échantillon sanguins, prélèvements qui seront ensuite conditionnés et stockés pour des analyses histologiques et biochimiques ultérieures. En fin de procédure, les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale.

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. 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 qualité 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.

16569 L'imagerie TEP (Tomographie par Emission de Positons) est une technologie d'imagerie nucléaire qui permet le diagnostic de nombreuses pathologies chez l'homme, en premier lieu les cancers. Ce diagnostic est réalisé au moyen de traceurs radioactifs informant sur le "comportement biologique" d'un organe, d'une partie d'un organe ou, par exemple, d'une tumeur (présence d'une tumeur, métabolisme tumoral, évolution métastatique, suivi thérapeutique, etc..). Dans le contexte des cancers, l'identification de cibles biologiques, le développement d'outils d'imagerie et/ou de thérapie sont cruciaux pour la prise en charge personnalisée des patients. Ainsi, dans les cancers du sein, plusieurs options thérapeutiques existent, mais celles-ci vont varier notamment en fonction du type de cancer, caractérisé notamment par la présence de certains récepteurs membranaires sur les cellules cancéreuses. Ces récepteurs constituent ainsi des cibles diagnostiques et/ou thérapeutiques potentielles. La caractérisation des tumeurs est donc une étape préalable au choix de l'option thérapeutique. Parmi ces options, la radioimmunothérapie utilise des anticorps couplés à des isotopes radioactifs avec comme objectif le ciblage spécifique des tumeurs et la délivrance de l'énergie radioactive (action thérapeutique) à cette dernière. Cela permet d'irradier spécifiquement les tumeurs tout en limitant la toxicité périphérique. De nombreux travaux sont activement menés dans l'étude de ces nouveaux outils, tant sur le plan du ciblage que sur celui du couplage des isotopes radioactifs (radiochimie) à ces molécules biologiques (anticorps, fragments d'anticorps, peptides, etc..).

Des travaux récents réalisés au sein de notre équipe ont mis en évidence l'intérêt de l'utilisation d'un macrocycle comme agent de complexation du cuivre-64 à des fins d'imagerie TEP. En effet, ce macrocycle forme des complexes chimiquement stables avec le cuivre-64 et ce dans des conditions douces de radiomarquage (température, pH). Couplé à un vecteur de faible poids moléculaire ciblant les protéoglycanes puis radiomarké, ce dernier permet, après administration sur modèles animaux (rat, lapin), un ciblage spécifique des tissus visés (e.g. cartilages) associé à une faible trans-méallation et/ou trans-chélation *in vivo* au regard des activités négligeables retrouvées au niveau hépatique, organe central du métabolisme du cuivre. En tenant compte de ces propriétés remarquables, ce macrocycle pourrait donc être d'un intérêt certain pour le développement de radiopharmaceutiques dédiés à l'imagerie phénotypique et basés sur des biomolécules chimiquement et thermiquement fragiles telles que les anticorps monoclonaux et leurs fragments (e.g. diabody, Fab, scFv).

Dans ce cadre, ce projet portera sur une étude de biodistribution de fragments scFv anti-HER2 radiomarkés par le cuivre 64 chez la souris nude porteuse de tumeurs de cancer du sein. Les fragments scFv seront fonctionnalisés avec notre macrocycle. Les conjugués ainsi obtenus seront radiomarkés par le cuivre-64 puis étudiés tant *in vitro* (stabilité dans différents milieux biologiques, détermination de la fraction immuno-réactive, captation cellulaire...) qu'*in vivo* (biodistribution, métabolisme).

Ces expériences *in vivo* 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 souris 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 souris. 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 souris seront placées sous anesthésie générale afin d'éliminer toute douleur potentielle et de réduire l'angoisse générée par la manipulation.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été optimisé. 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 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'imagerie 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, 1 fois par jour pendant 5 jours) 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).

Le nombre total d'animaux inclus dans ce projet est de 122 sur 5 années + 40 euthanasiés le 16/03/20 suite à la crise sanitaire COVID-19.

16570 Le disque intervertébral (DIV) est un tissu fibro-cartilagineux qui joue un rôle essentiel dans la cinématique rachidienne en assurant le rôle d'amortisseur. Il est constitué d'un réseau périphérique de fibres de collagène (Annulus fibrosus) qui englobe une structure gélatineuse hautement hydratée (Nucleus pulposus : NP). De façon inéluctable, cette structure subit au cours de la vie un processus de dégénérescence qui s'initie par une altération histologique et une déshydratation du NP. Cette dégénérescence explique environ 40% des lombalgies chez l'homme, faisant de ces atteintes un véritable problème de santé publique.

Face aux nombreuses limites des thérapies existantes les plus souvent extrêmement invasives, et au regard de l'amélioration des connaissances sur les rôles tenus par les miRNA dans la pathogénie de certaines maladies, la médecine régénératrice offre aujourd'hui de nouvelles perspectives de traitement pour les maladies dégénératives notamment squelettiques.

Dans ce contexte, le projet présenté propose de développer une approche originale de traitement de la dégénérescence discale par l'injection intradiscale par voie transannulaire de nanocapsules lipidiques renfermant des molécules de miRNA155. Il offrira les résultats préalables indispensables avant d'envisager les premiers essais cliniques chez le chien spontanément malade, puis une évaluation clinique chez l'Homme. Ce projet fait l'objet d'un financement de la Région Pays de Loire (Tremplin clinique vétérinaire - BIOREGATE).

Ce projet a pour objectif global de démontrer l'innocuité de cette approche thérapeutique. Cette phase d'expérimentation animale se déroulera sur une période de 4 mois. Afin de réaliser cette expérimentation, 5 brebis (3 DIVs injectés par animal) seront nécessaires. Dans un premier temps, l'absence de toxicité et d'apparition d'effets secondaires indésirables sera évaluée à court terme. Dans un second temps, il sera vérifié que les DIV concernés ne sont pas le siège, à moyen terme, d'une dégénérescence discale induite par la méthode d'injection. Cette évaluation sera réalisée par imagerie à résonance magnétique ainsi que par analyse histopathologique des DIVs injectés dans l'espèce ovine.

Ce projet respecte la règle des 3 R. En particulier, s'agissant d'un essai préclinique d'évaluation de l'innocuité d'un nouveau médicament *in vivo*, il n'existe pas d'alternative à l'utilisation de l'animal (remplacement). De plus, le nombre d'animaux a été limité au strict nécessaire. L'injection de plusieurs disques intervertébraux chez un même animal permet de réduire le nombre d'individus concernés par

cette expérimentation. Le recours à l'imagerie médicale permet également d'éviter des sacrifices à des temps intermédiaires et de réduire encore le nombre d'animaux utilisés. Enfin, les conditions d'hébergement correspondent aux standards en vigueur pour cette espèce : les animaux seront hébergés dans un enclos unique. Les animaux sont observés et examinés quotidiennement, ils ont accès libre au foin et à l'eau de boisson (ad libitum). L'alimentation est complétée par des granules spécifiques et par des pierres à lécher.

L'analyse statistique sera réalisée à l'aide d'un test de Wilcoxon apparié.

16571 En Europe, l'évolution actuelle des systèmes d'élevage de ruminants est en accord avec les principes de l'agroécologie. Cette évolution vise à réduire les intrants et maximiser l'utilisation des ressources fourragères locales notamment sur pied. Elle implique également l'acceptation d'un moindre contrôle de l'environnement et d'une part plus importante d'aléas, auxquels les animaux doivent s'adapter (Dumont et al., 2014, Animal). Cette adaptation passe par la robustesse des animaux vis-à-vis des challenges rencontrés au cours de leur vie productive afin de conserver un état de bien-être. Les futures études dans ce domaine, qui viseront à améliorer le bien-être animal et leurs conditions de vie devront donc prendre en considération cet élément. Or, pour étudier cette robustesse d'un point de vue comportemental, il est nécessaire de mettre en place des tests comportementaux qui interrogent ces différentes dimensions (adaptation au milieu, réaction au danger, résolution de problème). L'objectif général de ce projet est donc de réaliser une étude méthodologique portant sur deux tests liés à la robustesse comportementale : un test individuel (le test de prise de risque) et un test collectif (le test de réactivité en groupe) valides à la fois d'un point de vue scientifique et technique. Ceci est donc un projet de recherche fondamentale et appliquée dans le but de développer et standardiser des tests comportementaux pour les utiliser dans des projets ultérieurs. En réalisant une étude méthodologique, on concourt ainsi au raffinement des méthodes expérimentales en adaptant les tests, mais également à la réduction des effectifs en déterminant le nombre d'individus nécessaire pour répondre aux objectifs du test. Par la nature même de notre approche, qui est comportementale, l'utilisation de l'animal dans son intégralité est nécessaire pour répondre à nos objectifs scientifiques.

Ce projet méthodologique durera environ 3 mois et impliquera 45 agnelles réparties en trois lots. Le test de prise de risque correspond à un isolement social partiel de courte durée (<3min) selon trois modalités : deux types d'obstacles plus une combinaison des deux, que devra franchir l'animal. Le test de réactivité implique un stimulus anxiogène bref (<30s) selon trois modalités également : deux types de stimuli plus une combinaison des deux. Pour le 1er test, chaque lot d'agnelles testera une des 3 modalités, répétées deux fois. Pour le second, chaque lot testera les trois modalités, répétées deux fois. Compte-tenu de la sociabilité de l'espèce ovine et de la variabilité individuelle au sein d'un lot, l'effectif animal doit être suffisant pour répondre à l'ensemble des questions. Il a donc été choisi sur la base de données déjà existantes chez d'autres espèces et d'un outil en ligne de calcul statistique d'effectifs. La réalisation de cet essai permettra d'affiner cet effectif à l'avenir.

L'ensemble des animaux sera élevé selon leur mode d'élevage habituel en parcours à l'extérieur. L'eau sera accessible ad libitum grâce à des citernes, et de nombreux arbustes (buis, genévriers...) permettront aux animaux de s'abriter des conditions climatiques défavorables. Le test de réactivité aura lieu sur leur lieu de vie. Le test de prise de risque sera lui réalisé dans une arène à laquelle les animaux auront été habitués pour limiter leur angoisse. Les agnelles y seront menées via un personnel compétent et formé. La surveillance des animaux sera journalière et elle aussi réalisée par un personnel compétent. La présence de signes cliniques sera prise en compte dans la décision de l'application des critères d'arrêt mis en place pour l'expérimentation. Il en va de même lors des tests : une surveillance minutieuse des animaux sera réalisée et permettra l'arrêt à tout instant du test si la situation le nécessite. En cas de blessure potentielle lors d'un test, ce dernier sera immédiatement arrêté et l'animal recevra sans attendre les premiers soins. Suivant la gravité établie de la blessure, l'assistance d'un vétérinaire pourra être sollicitée.

A l'issue de ce projet, toutes les agnelles rejoindront le troupeau général de l'établissement utilisateur, sans conséquences ou séquelles attendues.

16572 Le trouble cognitif est un trouble mental fréquent au cours du vieillissement normal puisqu'il touche jusqu'à 50 % des sujets âgés de plus de 55 ans. Les principaux types de troubles cognitifs marqués sont le délire, la démence, la perte d'attention et l'amnésie. Les cas les plus sévères sont associés aux maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington. A l'heure actuelle seul quatre médicaments (donepezil, rivastigmine, galantamine et memantine) sont reconnus officiellement pour le traitement des symptômes cognitifs. Leurs effets restent modestes et ils ne sont pas dénués d'effets secondaires dont les plus courants sont des troubles gastro-intestinaux. Ainsi, la recherche vise à trouver un médicament plus efficace sans effets secondaires majeurs et à disséquer les mécanismes conduisant aux troubles cognitifs.

En tant que société de prestation de services nous proposons à nos partenaires industriels biopharmaceutiques différents tests standards permettant l'évaluation de l'efficacité de leurs nouvelles molécules. Nous utilisons soit (i) le test de la reconnaissance d'objet ; soit (ii) l'apprentissage de l'évitement d'un comportement naturel par d'un stimulus de peur. Dans les deux cas nous perturbons le processus d'apprentissage des rats par des agents pharmacologiques ou non afin de tester le potentiel de nouvelles molécules à rétablir les phénomènes d'apprentissage quand ces derniers sont altérés. Dans le cadre de notre activité de sous-contrat, nos partenaires industriels fournissent les données non confidentielles nécessaires à la réalisation des expériences, à savoir, les doses à tester, les voies et les fréquences d'administration. Neurofit les assiste dans le choix ainsi que dans la pertinence du(es) procédures(s) à mettre en oeuvre en adéquation avec l'indication thérapeutique souhaitée. 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, les processus de mémorisation et d'apprentissage étant des phénomènes complexes qui mettent en jeu plusieurs acteurs 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 approprié (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), un enrichissement de l'environnement (bâton et boule en bois), 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 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 4 320 rats est envisagée. Cela nous permettra de tester jusqu'à 50 molécules de nos clients

16573 Le paludisme est dû à des parasites du genre *Plasmodium* transmis à l'être humain par des piqûres de moustiques infectés. En 2016, 216 millions de cas de paludisme et 446 000 décès ont été rapportés par l'Organisation Mondiale de la Santé (World Malaria Report 2017). La majorité des victimes sont des enfants de moins de 5 ans et des femmes enceintes. Plusieurs espèces de macaques du Sud-Est Asiatique sont naturellement infectés par diverses espèces de *Plasmodium* responsables du paludisme.

La campagne actuelle pour l'éradication du paludisme fait face à deux obstacles. Le premier obstacle est dû à l'existence de deux des parasites de l'être humain (*Plasmodium vivax* et *P. ovale*) qui persistent dans le foie des personnes infectées sous une forme dormante, appelée hypnozoïte. Cette forme échappant ainsi aux traitements classiques est le principal obstacle à l'éradication du parasite et est donc la cible majeure de la recherche thérapeutique contre le paludisme. Le second obstacle est lié au fait que des parasites de macaque, animaux endémiques dans le Sud-Est Asiatique et non ciblé par les campagnes d'éradication, peuvent infecter les humains (infection zoonotiques). Dans ces régions, les parasites *P. knowlesi*, et *P. cynomolgi* sont retrouvés chez l'homme, et en particulier la Malaisie où *P. knowlesi* est l'espèce dominante chez les cas humains. *P. cynomolgi* (une espèce fortement

apparentée à *P. vivax* qui infecte naturellement *Macaca fascicularis*) forme aussi des hypnozoïtes et est, de ce fait, le modèle idéal pour ces recherches. Nous ne disposons que de rares observations sur l'évolution de ces parasites chez leurs hôtes naturels. De plus, toutes les investigations futures seront limitées par le fait que nous ne disposons que de quelques souches obtenues au cours des années 1960. Ainsi, la connaissance de cette évolution et l'utilisation de nouvelles souches plus récentes seraient nécessaires à toutes interprétations valides d'éventuels essais vaccinaux ou chimiothérapeutiques.

Nous avons obtenu des isolats de *Plasmodium* à partir d'échantillons de sang de macaques prélevés en 2017 en Malaisie, afin de constituer une nouvelle panoplie de souches de *P. cynomolgi* ainsi que de *P. knowlesi*.

Nous avons récemment développé un modèle de culture *in vitro* d'hypnozoïtes dans des cellules hépatiques de primates non humains (PNH), autorisant ainsi, pour la première fois, l'étude de la biologie de ces formes dormantes et une évaluation préclinique de nouvelles molécules thérapeutiques.

Ce modèle nécessite d'exposer les cellules hépatiques à une autre forme du *Plasmodium*, appelée sporozoïte qui est celle inoculée par les moustiques. Les sporozoïtes sont aussi nécessaires pour des tests précliniques de formulations vaccinales visant à induire une immunité stérilisante contre l'acquisition naturelle de l'infection par piqûre de moustiques infectés. Actuellement, il n'existe pas de méthode de culture *in vitro* permettant la production des parasites capables d'infecter des moustiques pour produire des sporozoïtes, ce qui nécessite d'infecter des primates non humains par *Plasmodium* afin d'obtenir les échantillons sanguins nécessaires pour infecter des moustiques.

- Une première partie du projet consiste donc à utiliser des animaux pour produire des sporozoïtes. Nous produirons donc la souche de référence des années 60, et nous produirons et caractériserons les nouvelles souches de 2017. Une sous-partie est destinée à développer une souche de *Plasmodium* pour laquelle nous pourrions nous passer de l'utilisation des macaques pour produire les formes infectant les moustiques. Pour cela nous utiliserons une lignée de *P. cynomolgi* (K4) dont les stades sanguins peuvent être maintenus en culture *in vitro*, mais cette souche ne produit pas de gamétocytes. Nous espérons pouvoir obtenir à partir d'une souche K4 génétiquement modifiée ou d'autres isolats des lignées cultivables *in vitro* avec une production adéquate de gamétocytes. Ceci permettra de réduire le nombre d'animaux à infecter.

- Dans une deuxième partie de l'étude, nous avons l'objectif de développer et d'évaluer des vaccins qui ciblent les formes sporozoïtes du *Plasmodium*. Pour ce faire, nous vaccinerons les animaux, évaluerons leur réponse aux vaccins, puis ils seront exposés aux souches parasitaires hétérologues que nous aurons produit.

Afin de limiter le nombre d'animaux, chaque animal servira à plusieurs infections consécutives (l'infection chez *M. fascicularis* est peu pathogène et les traitements sont efficaces), et, si disponibles, des animaux ayant servis dans des protocoles non-infectieux dans le cadre d'autres projets seront utilisés.

Les 110 animaux (PNH: *M. fascicularis* en majorité et *M. mulatta* où les parasitemies élevées permettent une production substantielle de sporozoïtes) utilisés pour l'étude sont nés et élevés dans des établissements agréés. La grande majorité sera utilisé pour la production de parasites et environ un tiers d'entre eux pour la validation des vaccins candidats. Le nombre a été réduit au minimum nécessaire pour la production et pour la validation statistique de l'efficacité vaccinale. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance (inoculations du parasite et prélèvements de sang sous anesthésie, limitation des volumes prélevés). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte l'apparition d'éventuels effets inattendus. Le vétérinaire de l'installation sera alerté dès le moindre signe de souffrance afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en modules individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

16574 Notre étude se propose de mettre en évidence des effets jusqu'à présent non décrits dans les tissus musculaires et hépatiques d'une substance employée dans la pratique clinique depuis plus de 30

ans. Administrée de manière chronique à un très grand nombre de patients, elle est prescrite dans plusieurs maladies liées au dysfonctionnement du système pour lequel elle a été conçue. De plus, elle est fabriquée à large échelle par plusieurs entreprises pharmaceutiques. Pour cette raison, la nature et le nom de la molécule ne pourront être communiqués jusqu'à confirmation de nos hypothèses. Nous utiliserons le nom X309 pour désigner cette substance.

Notre projet concerne à la fois la recherche fondamentale et translationnelle. Les objectifs sont l'analyse qualitative et quantitative des effets de X309 sur la vascularisation et la régénération tissulaire et l'identification des mécanismes physiologiques impliqués dans ces effets permettant le développement d'une thérapie pro-régénérative. Les résultats obtenus auront potentiellement un impact majeur sur la prise en charge des patients, notamment dans les maladies du cœur, comme l'infarctus du myocarde.

L'étude *in vivo* dans un modèle murin reste une étape indispensable pour la compréhension des mécanismes complexes qui interviennent lors de la régénération tissulaire (nous nous focaliserons notamment sur l'effet de la substance X309 sur les cellules souches). Notre étude se focalisera sur le muscle strié squelettique et le foie, deux tissus présentant de fortes capacités de régénération.

Dans le cadre de ce projet nous utiliserons des modèles murins transgéniques ou non, avec un total de 532 animaux sur une période de 5 ans, afin de réaliser six procédures expérimentales dont cinq sont de classe modérée, concernant 392 animaux et une de classe légère, concernant 140 animaux. Pour étudier la régénération musculaire, nous utiliserons des modèles lésionnels classiquement décrits dans la littérature et qui sont peu douloureux (la douleur éventuelle étant par ailleurs bien soulagée par l'utilisation d'antalgiques). L'étude de la régénération hépatique se fera grâce au modèle d'hépatectomie partielle, modèle couramment utilisé dans la littérature qui consiste en une ablation de deux tiers de la masse hépatique. La principale complication est un risque hémorragique lors de la procédure chirurgicale qui est immédiatement objectivable. La douleur post-opératoire immédiate est bien soulagée par l'utilisation d'antalgiques, et la littérature ne décrit pas de phénotype dommageable ultérieur.

Les animaux utilisés seront des souris adultes mâles âgés de 4 à 10 semaines selon les souches murines et les procédures expérimentales. Nous utiliserons en particulier des souris génétiquement modifiées permettant de visualiser plus facilement les cellules d'intérêt que sont les vaisseaux et les cellules souches musculaires, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires au projet.

La deuxième partie de l'étude, centrée sur la caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires, sera réalisée *in vitro*, de façon à réduire le nombre d'animaux d'expérimentation.

Sont mis en œuvre dans le cadre de ce projet, : 1) une analyse statistique de façon à déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaire par groupe d'expérimentation, 2) des procédures d'anesthésie/analgésie pour toutes les manipulations qui seront effectuées, 3) des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation sur l'animal par une mise à mort dès qu'ils sont atteints, 4) des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux, et 5) une valorisation de chaque animal avec un partage des prélèvements par nos différentes équipes de recherche.

16575 Les cellules dendritiques sont les sentinelles de notre système immunitaire. Elles patrouillent dans les tissus périphériques tels que la peau en échantillonnant le milieu extracellulaire qui les entourent à la recherche de pathogènes ou de signaux de danger pour l'organisme. Quand elles détectent un signal de danger, elles acquièrent un mode de migration plus rapide et dirigé vers les ganglions lymphatiques à proximité où elles activent les lymphocytes T, ce qui induit une réponse immune. L'échantillonnage de l'environnement et la migration des cellules dendritiques dans les tissus puis vers les ganglions, et l'activation subséquente des lymphocytes T sont essentiels pour les réponses immunitaires contre les infections (virales ou bactériennes), mais aussi pour les réponses anti-tumorales ou pour le succès de la vaccination. L'échantillonnage de l'environnement et la migration des cellules dendritiques sont deux processus mutuellement exclusifs, qui requièrent de profondes modifications du cytosquelette, le squelette de la cellule, dont l'organisation et la contraction sont finement régulés par différentes protéines.

Nous souhaitons comprendre comment l'échantillonnage de l'environnement et la migration des cellules dendritiques en périphérie (peau) puis vers les ganglions est régulée au niveau du cytosquelette. Pour cela, nous testons d'abord des molécules candidates *in vitro*. Si nous observons un effet *in vitro* sur l'échantillonnage ou la migration des cellules dendritiques, nous évaluons ensuite l'impact de ces molécules *in vivo* en utilisant le modèle murin, modèle de choix pour les études en immunologie de par les similitudes de son système immunitaire avec le système immunitaire humain. Ces expériences sont indispensables pour valider et compléter nos résultats obtenus *in vitro*. Ces connaissances fondamentales peuvent permettre d'identifier des molécules améliorant la migration des cellules dendritiques aux différentes étapes de la réponse immunitaire, molécules qui pourraient ensuite être exploitées dans différentes stratégies thérapeutiques contre les infections, les tumeurs, les maladies auto-immunes ou pour améliorer l'efficacité des vaccins.

Dans un premier temps, nous étudierons l'échantillonnage de l'environnement par les cellules dendritiques au niveau des tissus périphériques, en prenant comme modèle d'étude la peau. L'échantillonnage se fait par un processus d'internalisation du liquide entourant les cellules. Pour le quantifier, un petit volume de liquide fluorescent est injecté dans la peau, au niveau du dos, puis la quantité de fluorescence ingérée par les cellules dendritiques est analysée à différents temps (entre 5 et 20 min). L'injection se fait sous anesthésie pour assurer la meilleure reproductibilité possible des injections. Le dommage escompté est équivalent à celui d'une piqûre.

Dans un deuxième temps, nous étudierons la migration des cellules dendritiques dans les tissus périphériques, en utilisant comme modèle de tissu la peau. Cette étude est réalisée en comparant, par imagerie intravitale dans le même tissu, les cellules dendritiques sauvages et déficientes pour l'élément du cytosquelette testé, afin de limiter la variabilité expérimentale et de limiter le nombre d'animaux utilisés. Cette procédure requiert donc la réalisation d'animaux chimériques, ce qui implique une irradiation, conduisant à des dommages temporaires au niveau de l'intestin, à la déficience temporaire du système immunitaire des animaux concernés, déficience comblée par le transfert de moelle osseuse rétablissant un système immunitaire compétent. L'imagerie de la peau de l'oreille ne nécessite pas de chirurgie. Elle est réalisée sous anesthésie, sur un tapis chauffant.

Dans un troisième temps, nous étudierons le transfert par les cellules dendritiques d'un antigène de la périphérie (peau) vers le ganglion drainant. Un antigène fluorescent, en combinaison avec un agent inflammatoire, est appliqué au niveau de la peau du dos de souris sauvages ou déficientes pour l'élément du cytosquelette testé, puis la quantité d'antigène fluorescent parvenant au ganglion drainant est quantifiée à différents temps (entre 1h et 48h). Les dommages escomptés sont une légère inflammation de la peau de courte durée.

Dans un quatrième temps, nous étudierons la migration des cellules dendritiques de la peau jusqu'au ganglion. Un nombre défini de cellules dendritiques, sauvages ou déficientes pour l'élément du cytosquelette testé et préparées *in vitro*, est injecté dans la peau du coussinet plantaire, puis le nombre de cellules dendritiques arrivant au ganglion drainant est quantifié à différents temps (4h et 16h). Les dommages à l'animal sont équivalents à celui d'une piqûre et une légère inflammation du coussinet plantaire ne gênant pas la marche.

Dans chacune de ces procédures, nous utiliserons des souris non transgéniques et des animaux génétiquement modifiés présentant ou pas une délétion d'une molécule impliquée dans la régulation de cytosquelette d'actine, ceci spécifiquement dans les cellules dendritiques. Pour la réalisation de ce projet, nous utiliserons un total maximal de 408 souris.

Remplacer : Les expériences *in vivo* envisagées enrichiront les expériences déjà réalisées *in vitro*, qui ont donné le maximum de réponses aux hypothèses posées par notre problématique.

Réduire : Des expériences pilotes seront réalisées pour déterminer les meilleures conditions dans la réalisation des expériences *in vivo*, et en particulier déterminer le temps expérimental mettant en évidence les plus grandes différences entre groupe test et groupe contrôle. Les expériences seront conduites pour éviter au maximum la variabilité entre les répliques nécessaires à la qualité statistique.

Raffiner : Le confort des animaux sera pris en compte lors des différentes procédures, que ce soit dans les conditions expérimentales notamment avec l'emploi d'un anesthésiant et d'un analgésique ou que ce soit dans les conditions d'hébergement. Par ailleurs, l'état de bien être des souris est évalué

quotidiennement en suivant une grille de score avec différents points limites qui si ils sont atteints conduisent à l'arrêt de la procédure, et au sacrifice de l'animal pour éviter toute souffrance.

16576 L'évaluation préclinique efficace des nouveaux médicaments repose notamment sur la mise en œuvre de modèles animaux pertinents, fiables, robustes et dont les résultats sont reproductibles. La pertinence des modèles est une valeur inhérente au protocole mis en œuvre et l'évaluation de ce paramètre est assurée par une bonne connaissance de l'évolution de l'état de l'art. Cependant, la fiabilité, la robustesse et la reproductibilité des résultats dépendent en grande partie des compétences des personnes qui mettent en œuvre les procédures. Ainsi, assurer une bonne formation de nos collaborateurs aux procédures et maintenir leur haut niveau de compétence est d'une grande importance pour les recherches futures.

Dans ce projet, nous travaillerons à l'acquisition et au maintien de la qualification de nos collaborateurs pour la réalisation de tests particuliers. Il s'agit de mettre en œuvre 8 procédures indépendantes mesurant la mémoire des animaux, leur niveau basal de stress ou de désespoir. Les personnels novices apprendront sous la responsabilité de personnes qualifiées la mise en œuvre de nos procédures de comportement dans nos conditions habituelles d'exécution. Mais ces personnes novices pour des tests comportementaux particuliers ont par ailleurs l'habitude d'expérimenter sur rongeurs et sont formées au respect de leur bien-être

Dans le cadre du respect de la règle des 3R,

Remplacement : Avant que les personnes novices ne réalisent elles-mêmes des tests comportementaux, elles auront observé en direct ou grâce à des tutoriels vidéo, des manipulateurs expérimentés et auront étudié divers documents leur permettant d'être éclairées sur la technicité à acquérir. Cette phase permet de réduire le nombre d'animaux utilisés pendant la phase d'apprentissage des tests. Car en effet, l'entraînement avec des animaux vivants est indispensable avant de réaliser une étude, car les biais liés aux différences entre manipulateurs peuvent être source d'erreurs importantes. A ce jour, aucune méthode ne remplace complètement l'utilisation d'animaux vivants pour l'entraînement à la réalisation de tests comportementaux spécifiques.

Raffinement : le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations par respect de l'animal mais également pour éviter les biais expérimentaux. Ainsi, des mesures sont mises en œuvre, notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 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, programme d'enrichissement régulièrement revu par la SBEA), observations répétées). Les apprentissages font l'objet d'une progression méthodique rigoureusement évaluée par le tuteur présent tant qu'il est nécessaire.

Réduire : nous limiterons le nombre des animaux utilisés dans ce projet au strict minimum nécessaire pour valider l'utilisation d'un test en routine. Seules les différences de comportements entre les animaux contrôles, les animaux induits et les animaux induits traités avec une molécule de référence seront recherchées et étudiées. Nous ferons ces tests dans des conditions déjà parfaitement maîtrisées au sein de notre établissement. L'entraînement d'une personne s'arrête dès que qu'elle obtient des résultats conformes à ceux des personnes expérimentées. Si la progression d'une personne n'était pas conforme aux attentes (si la procédure d'apprentissage ne se réalise pas comme attendu), induisant potentiellement un nombre d'animaux utilisé supérieur à ce qui était prévu, la SBEA serait alertée pour en chercher les causes (inhérentes à la personne, aux animaux, ou environnementales)

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte de 10 à 20 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 2520 souris et de 1740 rats est envisagée.

16577 De nombreuses recherches actuelles portent sur l'utilisation de méthodes alternatives et/ou raffinées (règle des 3R) à l'expérimentation sur les dits « gros » animaux (animaux de ferme tels que les ruminants ou les porcs). Dans ce contexte, en vue de réduire l'utilisation massive de porcs en installation expérimentale, et dans le cadre d'études focalisées sur le microbiote intestinal porcin, des

essais de transplantation fécale porcine chez des rats axéniques sont proposés. L'utilisation de ce modèle permettrait en effet de :

i/ réduire le nombre d'animaux puisque l'utilisation d'un nombre moins important de rongeurs axéniques par rapport au nombre de porcs serait suffisant pour permettre une exploitation statistique satisfaisante des résultats (ce qui est dû à une variabilité inter-individuelle beaucoup plus faible chez le rongeur axénique). Plus précisément, moins d'animaux seraient nécessaires par traitement, et ceci, ajouté aux conditions d'expérimentation plus aisées sur les rongeurs que sur les gros animaux permettraient de tester bien plus de traitements par expérimentation et de limiter considérablement le nombre d'animaux appartenant au groupe contrôle.

ii/ remplacer l'utilisation de gros animaux en installation expérimentale (porcs) par un nombre réduit d'animaux (rongeurs gnotobiotiques) puisque l'étude du microbiote intestinal porcin éventuellement soumis à des contraintes environnementales ou à des tests de suppléments en probiotiques ne peut être évaluée que sur un organisme vivant pris dans sa globalité

iii/ raffiner les conditions expérimentales puisque un nombre plus important d'analyses et de manipulations pourra être réalisé sur un nombre moins élevé d'animaux grâce à l'utilisation de ce modèle. Le suivi du microbiote fécal étant la base de notre projet, des prélèvements fécaux très réguliers et/ou en cinétique est possible chez les rongeurs où le matériel fécal est disponible quasiment en continu sans procédure particulière, alors que chez le porc, des prélèvements répétés directement dans l'ampoule rectale constituent une procédure invasive en elle-même et se font très rarement sans douleur et inflammation.

iv/ réduire les risques sanitaires lors de l'expérimentation puisque la surveillance de rongeurs est plus facile à gérer que celle de gros animaux.

La validation d'un tel modèle permettrait par exemple l'étude de l'effet d'additifs alimentaires sur le microbiote digestif porcin, l'évaluation de la réponse du microbiote intestinal porcin à différents stress environnementaux.

Dans l'essai de transplantation fécale porcine proposé, quatre microbiotes porcins différents seront inoculés chez des rats axéniques afin de valider ce modèle. De plus, un second paramètre sera testé quant à l'utilisation de selles congelées pour permettre l'établissement d'un microbiote complet et fonctionnel par rapport à l'utilisation de selles fraîches. Ces résultats seront utiles puisque l'installation expérimentale de porcs est distante géographiquement des compétences en microbiologie, ce qui rend difficile un suivi microbiologique régulier. Ce modèle permettrait ainsi de délocaliser les analyses microbiologiques.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux (n=80) a été déterminé sur la base de la bibliographie et d'une puissance statistique nécessaire à la validation du modèle, permettant une utilisation réduite du nombre d'animaux. Tout au long de l'expérimentation, une surveillance quotidienne sera mise en place pour détecter, réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux.

16578 Ce projet a pour objectif de mieux comprendre le rôle de la signalisation énergétique cellulaire, plus particulièrement d'une voie de signalisation intracellulaire par une protéine kinase. Cette protéine kinase est un senseur métabolique qui s'active lorsque la cellule est en déficit énergétique et qui ensuite contrôle les voies métaboliques pour préserver l'homéostasie énergétique tant à l'échelle cellulaire que de l'organisme entier. Ici nous envisageons de caractériser la localisation intracellulaire de cette protéine et sa translocation éventuelle dans une situation de stress énergétique. Nous essaierons aussi d'identifier ses partenaires d'interaction. Ces questions sont importantes, car des évidences récentes suggèrent que la compartimentation cellulaire et la formation de complexes sont essentielles pour la régulation et signalisation cellulaire.

Dans ce but, nous allons utiliser les différents organes (surtout cœur et foie) de rats pour isoler les organelles (p.ex. mitochondries ou membrane plasmique) par des procédures de subfractionnement bien établies dans notre laboratoire. Les mesures seront complétées par des analyses en immunoblotting et des tests fonctionnels pour caractériser la protéine d'intérêt. Le recours à des tissus

animaux, à côté de culture cellulaire, permettra d'approfondir nos connaissances sur la fonction, les interactions de cette protéine dans les différents compartiments cellulaires de tissus de mammifères.

L'expérimentation incluant 40 animaux a été planifiée en respectant la règle des 3R : 1-Réduire : Le nombre d'animaux nécessaire n'est pas élevé dans ce type d'approche. L'exploitation maximale du matériel biologique est également prévue dans l'étude (différents organes seront prélevés, différents dosages réalisés). 2- Raffiner : Les choix concernant le modèle et les procédures ont été faits conformément à l'état actuel des connaissances et exigences envers ce type d'étude, en veillant au maximum au bien-être des animaux au cours de l'hébergement et des différents protocoles d'étude. Les procédures envisagées n'entraînent pas de souffrance des animaux. 3-Remplacer : L'étude constituera un complément nécessaire aux études fait en parallèle avec les cultures cellulaires, en permettant d'étudier les possibles influences d'un organe sur un autre.

16579 Le projet s'inscrit dans le cadre d'une recherche fondamentale. Son but est de tester l'efficacité d'un nouveau traitement contre la spasticité. La spasticité est un trouble de la motricité qui apparaît chez environ 70 % des personnes atteintes de lésions de la moelle épinière. Elle est caractérisée par des réflexes tendineux (réflexe d'étirement du muscle) hyperactifs, des spasmes, des co-contractions de muscles antagonistes et des réactions exacerbées à des stimuli sensoriels normalement anodins. Ainsi, le simple glissement d'un vêtement ou d'un drap peut les provoquer, engendrant des difficultés majeures dans la vie de tous les jours (trouble du sommeil, difficultés à se vêtir...).

Il a été montré chez l'homme et chez le rongeur que la spasticité était due à une dérégulation du réseau de neurones de la moelle épinière innervant les muscles locomoteurs. Dans le laboratoire, nous avons montré que ce déséquilibre, après une lésion de moelle épinière, était dû à une perturbation dans l'expression de plusieurs protéines à la surface des neurones causée par l'activation anormale d'une enzyme : la calpaïne.

Notre projet consiste à bloquer spécifiquement cette enzyme dans les neurones qui innervent les muscles spastiques, en utilisant un outil génétique transporté par un vecteur viral. Pour évaluer l'efficacité de ce procédé, nous ferons des enregistrements électromyographiques (spasmes, co-contractions de muscles antagonistes) des muscles spastiques après injection du traitement sur animal vigile non contraint grâce à l'implantation d'électrodes d'enregistrement chronique. A la fin de cette série d'enregistrements, tous les animaux seront mis à mort pour pouvoir réaliser des contrôles immunohistochimiques sur les moelles épinières de tous les animaux afin d'analyser l'expression des protéines d'intérêt. Nous utiliserons 48 rats adultes pour cette étude, répartis sur 3 séries successives. Ils seront implantés d'électrodes afin d'enregistrer les activités musculaires des muscles extenseur et fléchisseur de la patte postérieure droite.

Pour répondre à la règle des 3R: Le nombre de rongeurs par groupe expérimental sera limité à son strict minimum compte tenu des contraintes de chaque technique expérimentale, avec des analyses statistiques adaptées (REDUCTION). De plus, le lancement de la série suivante sera conditionné par les résultats de la précédente, permettant une réduction du nombre d'animaux à utiliser si la significativité est atteinte plus rapidement (REDUCTION).

Puisque la spasticité apparaît à partir d'1 mois après lésion et que l'outil génétique peut être observable et quantifiable 1 mois après son injection, nous limiterons notre étude à 2 mois après lésion (RAFFINEMENT). Une médication adaptée (anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires, antibiotiques) sera mise en œuvre pour éviter toute douleur ou souffrance des animaux (RAFFINEMENT). Pendant la durée de l'expérience, les animaux sont hébergés de manière individuelle pour éviter toutes complications de cicatrisation qui pourraient intervenir lors des interactions sociales. D'autre part, il y aura un suivi régulier des animaux durant toute la procédure. Ce modèle animal de spasticité ne peut être remplacé par un autre modèle car la spasticité est un trouble complexe qui fait intervenir plusieurs processus physiologiques, en particulier des réseaux de neurones interconnectés, ne pouvant être observés que chez un animal vivant (REMPACEMENT). De plus, des publications antérieures ont été acquises sur ce modèle animal (dont plusieurs de notre laboratoire) et elles constituent la base de notre étude (REMPACEMENT).

Ce projet, qui doit se dérouler sur 5 ans, comporte 4 procédures expérimentales, réalisées sur des animaux de souche non consanguine. L'objectif est de valider une méthode thérapeutique pour traiter la spasticité chez l'animal afin de pouvoir la proposer comme traitement envisageable chez l'homme. Une appréciation rétrospective sera faite à l'issue du projet.

16580 Ce projet consiste à utiliser des embryons de xénope (grenouille-*Xenopus Laevis*) à des stades précoces pour comprendre les mécanismes qui contrôlent les propriétés des tissus embryonnaires. Ces propriétés sont essentielles afin que chaque tissu puisse devenir soit relativement statique et rigide ou au contraire dynamique et capable de changer de position à l'intérieur de l'embryon, selon les besoins particuliers du développement. Cette question est absolument fondamentale pour comprendre comment un embryon parvient à se développer en un animal complexe, parfaitement organisé et fonctionnel, et nous renseigne aussi naturellement sur les conditions qui peuvent causer les défauts de développement. Ces régulations et les molécules impliquées sont quasiment identiques pour tous les animaux vertébrés, et ainsi le modèle amphibien de xénope est un système simple qui nous permet de répondre à des questions générales, valables également pour les mammifères et pour l'homme. Les propriétés migratoires des tissus embryonnaires sont d'une grande importance pour le développement embryonnaire. Elles sont complexes et mal connues et ne peuvent pas être reconstituées dans des modèles cellulaires *in vitro*, d'où la nécessité d'avoir recours à des animaux pour obtenir des embryons. Un des grands avantages uniques du xénope par rapport aux modèles mammifères est qu'en réponse simple à une simple injection d'hormone gonadotrope, les femelles pondent des centaines d'œufs, permettant ainsi de faire une série d'expériences en utilisant un minimum d'animaux. De plus, ces femelles xénopes peuvent être réutilisées après une période de repos de six mois et ceci durant plusieurs années, ce qui réduit encore le nombre d'animaux. La décision de garder en vie ces animaux pour les réutiliser 6 mois plus tard est prise par les membres du SBEA. Les 150 femelles et 40 mâles xénope que nous souhaitons acheter seront suffisante pour toute une durée de 5 ans afin de mener à bien un projet complet et ambitieux. Au laboratoire, les animaux sont hébergés dans une animalerie récente et agréée ce qui minimise le stress et améliore leur condition de vie. Nous disposons d'un appareillage neuf et spécifique issu d'un fournisseur agréé, de deux pièces climatisées, isolées afin d'éviter que l'expérimentation interfère avec les longues phases de repos. Les zootechniciens sont formés et dédiés à l'animalerie aquatique, ils peuvent soigner les animaux lorsque cela est nécessaire. Des raffinements spécifiques aux xénopes ont été implémentés, les bacs contenant des tuyaux PVC qui servent d'abris/cachette, ainsi qu'un complément alimentaire contenant des vers. Concernant le remplacement dans la règle des 3R, nous n'avons pas encore un modèle qui nous permet de remplacer ce modèle animal.

16581 Les adhérences sont une conséquence de la chirurgie abdominale et pelvienne avec une incidence postopératoire allant jusqu'à 90%. Les adhérences sont connues pour être responsables de douleurs chroniques associées à diminution de la qualité de vie des patients et sont la cause la plus fréquente de l'infertilité féminine secondaire. Soixante à soixante-dix pour cent des obstructions intestinales sont dues à adhérences et associées à un taux de mortalité de 4,3 à 13%. L'apparition d'adhérences post-chirurgicales est imprévisible et induit un problème postopératoire à très long terme générant un fardeau permanent pour les patients, les chirurgiens et le système général de santé.

L'utilisation de biomatériaux pour la prévention des adhérences post-chirurgicales a été démontrée dans plusieurs modèles animaux. Puisque la récupération péritonéale se produit dans les trois à cinq jours suivant l'opération, ces dispositifs doivent idéalement se dégrader dans ce délai afin d'éviter des effets indésirables qui pourraient causer des adhérences secondaires.

L'objectif de cette expérimentation animale est de comparer l'effet de différents biomatériaux dans la prévention des adhérences post-chirurgicales. Récemment, un modèle d'adhérence optimisé chez le rat (OPAM) a été utilisé pour induire des adhérences sévères et s'est avéré d'une grande reproductibilité. Ce modèle sera utilisé pour cette étude comparative. En collaboration avec des chirurgiens plastiques et vétérinaires, et après l'approbation du comité d'éthique, 80 rats seront opérés sous anesthésie générale. Après 7 jours de cicatrisation, les animaux seront euthanasiés et la

prépondérance des adhésions évaluée visuellement et par analyse histologique des tissus abdominaux.

Cette expérimentation sera réalisée dans le respect de la règle des 3R. Remplacer: Il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour évaluer l'effet de biomatériaux dans la prévention des adhérences post-chirurgicales. Réduire: le nombre d'animaux a été calculé par l'utilisation d'un test statistique. Raffiner: les animaux seront opérés par un chirurgien plastique expérimenté et recevront des analgésiques en post-opératoire afin de diminuer la douleur et la souffrance. Les animaux seront hébergés par 2 sur copeaux et cachette tube pour diminuer leur angoisse.

16582 Dans le cadre de la Licence STS mention SpS parcours Nutrition, des travaux pratiques (TP) sont organisés d'une part pour illustrer les enseignements de nutrition et métabolisme en situation physiopathologique et d'autre part pour sensibiliser les étudiants au déroulement des études animales en intégrant la dimension éthique et le bien-être animal conformément à la directive 2010/63/UE et le décret du 1er février 2013.

L'objectif de ces TP est d'étudier la réponse métabolique chez le rongeur en réponse à un stress. Ce dernier sera induit soit par un état catabolique via l'injection de lipopolysaccharide (LPS) (TP1), soit par un régime hyperprotéique ou hypercalorique (TP2), soit par restriction calorique suivie d'une renutrition (TP3) ou soit par induction d'une cachexie cancéreuse (TP4). Chaque année, un seul de ces TP sera réalisé. Ils s'appuient sur l'utilisation de rats, modèle bien adapté à l'exploration du métabolisme au niveau corps entier, circulant et tissulaire en réponse à des variations de l'état nutritionnel. Chaque année, un total de 20 animaux randomisé en 2 groupes de 10 seront utilisés. Ainsi au cours de la période de validité de l'expérimentation, au maximum 100 animaux seront utilisés. La règle des 3R sera respectée. Réduction : Le nombre d'animaux pourra être réduit à 8 par groupe mais pas en-deçà pour des raisons statistiques. Raffinement : Les rats seront hébergés la plupart du temps en cages collectives dans un environnement enrichi pour favoriser l'activité physique spontanée, les interactions sociales afin de limiter le stress à l'exception des temps nécessitant un suivi individuel de la consommation et de collecte d'urine réalisés durant lesquels ils seront placés individuellement en cage à métabolisme. Toutes les mesures seront mises en œuvre par les enseignants-chercheurs encadrants afin de réduire la douleur des animaux durant les procédures expérimentales telles que l'administration d'un analgésique ou l'anesthésie en cas d'atteinte d'un des points limites. Remplacement : Aucun modèle cellulaire ne peut se substituer à l'exploration des variations métaboliques au niveau corps entier, circulant et tissulaire. Les modèles envisagés ont été validés par la littérature scientifique.

16583 Les mutations activatrices dans les gènes FGFR2 et FGFR3 sont à l'origine de faciocraniosténoses et de chondrodysplasies. Les patients atteints présentent des malformations craniofaciales et maxillo-mandibulaires à l'origine de conséquences fonctionnelles et esthétiques sévères qui nécessitent le recours à des chirurgies osseuses majeures, avec risque de défaut de réparation osseuse.

Bien qu'il ait été montré que Fgfr2 et 3 soient exprimés dans les différentes phases du développement mandibulaire, la formation mandibulaire est peu étudiée et la réparation osseuse n'a jamais été étudiée dans ces pathologies.

Ce projet aura pour but de déchiffrer les rôles précis des gènes FGFR2 et FGFR3 au cours de la formation et de la réparation osseuse. Nous utiliserons deux modèles murins pertinents, un modèle de faciocraniosténose et un modèle de chondrodysplasie.

Nous étudierons dans nos modèles murins la formation osseuse mandibulaire en période anténatale à partir d'embryons murins, et postnatale, et le processus de réparation osseuse mandibulaire à l'âge adulte en utilisant des approches radiologiques, histologiques, et cellulaires.

Un autre volet de ce projet sera dédié aux approches thérapeutiques, avec l'analyse de la formation de la réparation osseuse mandibulaire en présence d'antagonistes des FGFRs.

Compte tenu de l'état actuel de nos connaissances, nous avons établi notre protocole de recherche afin d'atteindre nos objectifs tout en respectant la règle des 3 R. Les processus de formation et de réparation osseuse ont lieu dans un environnement tissulaire complexe impliquant des interactions entre l'os, les vaisseaux, et les tissus mous adjacents. Ces différents tissus agissent de concert pour

réguler la formation et la régénération osseuse. Expérimentalement, il n'est pas possible de reproduire la complexité de cet environnement dans un système cellulaire *in vitro* ou par modélisation mathématique. C'est pourquoi, des modèles animaux sont nécessaires à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la formation et de la réparation osseuse. Notre expérience dans ce domaine de recherche et dans l'utilisation des modèles murins nous permet de définir précisément le nombre maximum d'animaux en 5 ans (période anté et post natale), soit 910 animaux nécessaires aux tests statistiques requis, tout en limitant le nombre total d'animaux, en réduisant les temps de procédures, en regroupant les animaux contrôles, et en optimisant l'utilisation des animaux. Toutes nos expérimentations seront pratiquées sous anesthésie accompagnée d'une analgésie per opératoire et post opératoire et les animaux seront suivis quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation. Nous avons défini des points limites adaptés qui conduiront au sacrifice précoce de l'animal en cas de souffrance ou de douleur.

Les résultats de ces expérimentations permettront de mieux comprendre la formation osseuse et la réparation osseuse en conditions normales et pathologiques, et pourront apporter des perspectives thérapeutiques chez les patients porteurs de faciocraniosténoses et chondrodysplasies.

16584 Dans la production porcine certaines conditions et pratiques d'élevage que l'on retrouve actuellement peuvent être la cause de problèmes capables d'affecter à la fois le bien-être des animaux et leur performance.

L'une de ces pratiques est le mélange d'individus inconnus qui s'effectue, par exemple, lors des allotements des porcs en phase d'engraissement. Cela cause une forte augmentation des combats en diminuant, en parallèle, la croissance et donc la production.

Etant l'impact de tels effets négatifs sur le bien-être animal et la sphère économique très conséquent, il est nécessaire de trouver des solutions pour améliorer les conditions de détention et la qualité de vie de cette espèce.

Des phéromones apaisantes ont été initialement découvertes chez le porc et ont montré qu'elles réduisaient le comportement agonistique chez les porcelets, les porcelets sevrés et les truies.

Dans cette phase du projet l'intérêt est porté vers l'étude des comportements prosociaux (ex : comportements affiliatifs, interactions positives entre individus) et des comportements agonistiques (ex : morsures, bagarres) du porc.

L'objectif est d'étudier l'effet de l'analogue synthétique de la phéromone apaisante dans différentes situations critiques de la chaîne de production porcine pour augmenter les connaissances dans le domaine de la communication chimique, et plus particulièrement des phéromones, et pouvoir ainsi proposer des solutions pratiques aux éleveurs pour améliorer le bien-être et la performance du porc.

Pour cela, un essai visant à étudier l'effet potentiel de la phéromone apaisante du porc sur un modèle de regroupement d'individus a été envisagé pour confirmer l'hypothèse que la phéromone puisse réduire l'agressivité et/ou augmenter les comportements prosociaux et influencer d'autres indicateurs de bien-être positif ou négatif (stress) lors de la rencontre des animaux.

Nous nous intéressons au porc adulte (ou porc d'engraissement) et à une nouvelle galénique de la phéromone apaisante porcine en pour-on (Secure Pig (R) Flash).

Les animaux impliqués dans l'étude expérimentale ce sont des miniporcs élevés et utilisés à des fins scientifiques et qui représentent un modèle du porc de production.

Un totale de 12 miniporcs (mâles castrés et femelles) sera impliqué ; ces animaux sont tous hébergés par paires et répartis dans deux salles d'élevage identiques contenant chacune 3 enclos avec 2 animaux (6 individus par salle). Les animaux de la même salle profitent donc d'un contact visuel et olfactif avec les congénères.

Le test sera effectué dans une salle expérimentale à laquelle les animaux ont été habitués.

Ici, une rencontre entre deux individus appartenant à la même salle mais issus de deux enclos différents, sera réalisée dans un enclos « neutre » contenant seulement de la litière de copeaux.

Avant la réalisation des rencontres, deux types traitements seront appliqués sur les porcs : ou la phéromone apaisante en pour-on ou le placebo.

Le même traitement sera appliqué sur tous les animaux de la même salle, afin d'éviter l'influence du traitement sur les animaux avec placebo, ce qui signifie que tous les animaux d'une salle recevront la phéromone et tous les animaux de l'autre salle le placebo.

Ce sera une procédure en aveugle car les opérateurs ne connaîtront pas la nature du traitement appliqué.

Le jour de l'étude, 2 miniporcs seront transférés dans la salle expérimentale. La rencontre aura une durée de 5 minutes. Pendant la rencontre, il est attendu que certains cochons montrent des comportements prosociaux, d'évitement ou agressifs. Les opérateurs de l'étude seront cachés à l'extérieur de l'« enclos neutre » pendant la rencontre, avec une planche dans les mains pour séparer les cochons en cas de conflit, ceci étant dangereux pour les deux ou l'un d'eux (possibilité de morsures).

Les rencontres seront filmées et plusieurs paramètres comportementaux analysés : comportements agonistiques, comportements prosociaux et d'autres indicateurs de bien-être. De plus, des paramètres zootecniques (poids de l'animale, lésions corporelles) et ceux liés à la physiologie du stress (cortisol et alpha-amylase salivaires) seront inclus.

Pour l'analyse du cortisol et de l'alpha-amylase salivaires (indicateurs du stress aigue), des échantillons seront prélevés à l'aide d'une salivette tenue dans la bouche de l'animal avec une pince.

L'essai sera composé de 2 périodes : une période avec l'analogue de la phéromone et une avec placebo. Chaque période durera 2 semaines (12 rencontres, 6 par semaine, 2 par jour), avec une semaine de pause entre les deux traitements. La durée de la procédure expérimentale sera de 5 semaines, compte tenu de la semaine de pause.

Dans la réalisation de cet essai, le raffinement est pris en compte, ainsi que la réduction.

En ce qui concerne le raffinement, les animaux impliqués dans l'étude sont hébergés dans des enclos conçus pour répondre aux besoins physiologiques et comportementaux de l'espèce : étant cela une espèce sociale, les individus sont maintenus en couples ; le milieu est enrichi avec du matériel qui permet le fouissement (copeaux, paille) le jeu et l'exploration ; les animaux sont manipulés et socialisés régulièrement. Concernant la phase expérimentale, les miniporcs seront habitués au préalable à la salle de test, pour que l'arrivée ici ne soit pas une source de stress. Etant la rencontre une potentielle source de conflits, tout sera prévu pour éviter au maximum les comportements agressifs. Cela explique le choix de ne pas créer des rencontres entre animaux de deux salles différentes, le fait que l'enclos neutre ait une taille suffisante pour permettre aux animaux de rester à distance et le choix de ne pas utiliser des ressources, comme de la nourriture, qui pourraient causer de la compétition.

En ce qui concerne la réduction du nombre d'animaux, les miniporcs impliqués représentent une population d'animaux stable dans l'établissement et qui participe à plusieurs études évitant le recours à des individus nouveaux; cela est possible grâce à la taille réduite du miniporc d'expérimentation et à sa nature manipulable et sociable.

16585 Le Syndrome des Jambes sans Repos (SJR) est l'un des troubles neurologiques sensorimoteurs les plus répandus, affectant 6 à 11% des adultes dans les pays occidentaux. Le SJR se caractérise par un besoin de bouger les jambes notamment en période d'inactivité et particulièrement durant la nuit. Il peut ainsi conduire à des troubles du sommeil impactant la santé physique, mentale ainsi que les interactions sociales. Ces symptômes apparaissent au moment de l'adolescence mais s'aggravent avec l'âge indiquant une composante développementale mais aussi neurodégénérative. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace à long terme. Au niveau biologique, ce syndrome reste mal compris. Des mutations ou des polymorphismes du gène *Meis1* induisant la diminution de son expression sont fortement associés à cette maladie. D'après nos résultats préliminaires, *Meis1* pourrait affecter le développement ou la connectivité de circuits neuronaux contrôlant la motricité au niveau de certaines parties du cerveau (telles que le striatum, le cortex, le thalamus et le cervelet).

Le présent projet vise à déterminer les connectivités cortico-striatale, striato-thalamique et cerebello-thalamique. Nous envisageons ainsi d'injecter chez des animaux anesthésiés des traceurs de la connectivité neuronale afin de quantifier cette connectivité *ex vivo* sur les coupes histologiques du cerveau. Afin de REDUIRE au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons prévu de faire une étude pilote sur un petit nombre d'animaux (16) afin de déterminer les conditions optimales de

l'expérience et ainsi de réduire le nombre final de souris utilisées. De plus, des tests statistiques nécessitant un minimum d'animaux seront employés afin de comparer les communications neuronales entre les structures selon la présence de la mutation mais aussi en fonction du sexe et éventuellement du vieillissement. Toutefois, le modèle murin N'EST PAS REMPLAÇABLE et reste indispensable afin d'évaluer l'impact des mécanismes biologiques sur le comportement moteur ainsi que pour étudier les réseaux neuronaux dans leur ensemble. En vue de RAFFINER les procédures, les animaux sont hébergés dans des conditions optimales, ils font l'objet d'un suivi adapté et de soins vétérinaires au besoin. Les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie générale afin d'éviter aux animaux tout ressenti douloureux. De plus, durant la chirurgie, les yeux des animaux sont protégés du dessèchement. Ils sont préservés du refroidissement par l'emploi d'isolant durant l'opération et leur réveil se fait dans une enceinte chauffée. La douleur sera également prise en charge au niveau post-opératoire par l'administration d'analgésiques. Pour minimiser la neuroinflammation nous remplacerons les vecteurs viraux utilisés habituellement dans ce but par de nouveaux traceurs neuronaux élaborés pour un marquage plus rapide et plus efficace. Au total, un maximum de 434 souris sera utilisé sur 5 ans.

16586 L'épilepsie touche plus de 50 millions de personnes dans le monde. Les épilepsies focales sont parmi les plus fréquentes et sévères des épilepsies, conduisant parfois à une mort inattendue, nommée SUDEP ou MSIE en français (Mort Subite et Inexpliquée en Epilepsie). Il est nécessaire de comprendre les mécanismes à l'origine de ces crises afin de pouvoir développer de nouveaux médicaments antiépileptiques. Certaines formes génétiques d'épilepsie focale sont causées par des mutations dans les gènes *Lgi1*, *Depdc5* ou dans le gène X fragile (*FMR1*). Nous avons généré plusieurs lignées de souris, soit invalidées (KO), soit mutées, pour ces différents gènes afin de modéliser l'épilepsie humaine. Nos procédures expérimentales incluent l'étude du phénotype épileptique et comportementale (comorbides à l'épilepsie) par électroencéphalographie (EEG) vigiles, l'électrocardiographie sur animal vigile ou anesthésié, pour caractériser l'émergence de SUDEP, l'électroporation *in utero* et l'injection stéréotaxique de vecteurs viraux (pour modéliser l'aspect focal de l'épilepsie), et l'administration par voie orale ou IP d'agents convulsivants ou antiépileptiques. L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les modifications cérébrales secondaires à la délétion ou la mutation de ces gènes qui conduisent à des crises d'épilepsie, des altérations comportementales comorbides ou une mort inattendue afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques, et aussi de tester l'efficacité d'un nouveau traitement.

Nos études nécessitent l'utilisation d'animaux puisque: (1) Les modifications cérébrales conduisant à l'émergence de l'épilepsie ne peuvent pas être étudiées chez l'humain. (2) La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas certaines propriétés des crises d'épilepsie dans un cerveau entier tels que le site d'initiation et le patron de propagation des crises. (3) La modélisation *in silico* nécessite des données expérimentales encore manquantes. Les souris et les rats présentent de nombreux avantages: (1) La possibilité de reproduire l'anomalie génétique humaine grâce aux nouvelles techniques génétiques chez la souris et le rat. (2) Les rongeurs ont un cerveau suffisamment complexe pour générer des crises d'épilepsie. (3) De nombreux modèles d'épilepsie ont été développés dans ces deux espèces permettant d'avoir accès à d'abondantes données. Nous estimons qu'environ 2730 animaux (2180 souris et 550 rats) seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Nos travaux seront réalisés dans l'application de la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer).

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet, nous ferons une planification rigoureuse des expériences en testant préalablement la faisabilité des expériences, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques comme le test de student (réduire). Enfin, un soin particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, de la douleur et du stress des animaux grâce à l'utilisation combinée d'anesthésiques et de analgésiques, mais aussi de conditions d'hébergement adéquates et en milieu enrichi (raffiner). La culture neuronale sera privilégiée dans certains aspects de nos travaux (remplacer).

16587 L'objectif de ce projet est d'établir une banque d'ADN via la collecte d'échantillons biologiques sur les espèces félines et canines. Les échantillons seront utilisés dans des recherches génétiques, reliant certains marqueurs génétiques aux caractéristiques phénotypiques spécifiques (physiologiques, nutritionnelles, métaboliques, comportementales) des espèces étudiées. Des prélèvements sanguins seront réalisés sur des animaux adultes. Chaque animal ne sera prélevé qu'une seule fois sauf si l'échantillon ne permettait pas une extraction d'un échantillon d'ADN de qualité. Dans cette éventualité, un deuxième prélèvement unique pourra être réalisé avec un intervalle de 1 an minimum. Ces prélèvements de sang seront réalisés selon les bonnes pratiques vétérinaires, et les animaux seront sélectionnés afin que le volume prélevé (6 mL) n'ait pas de conséquences négatives sur leur bien-être et leur santé. Ce projet s'étalera sur une durée de 5 ans. Au regard des recommandations de la littérature pour la constitution d'une banque d'ADN, les prélèvements d'ADN seront réalisés sur un échantillon de 500 chats et 250 chiens. Dans le cadre de ce projet, les principes des 3R ont été appliqués de la manière suivante: 1) Remplacer: pour ce projet, il n'est pas possible d'utiliser un modèle alternatif au modèle in-vivo, compte tenu que les données génétiques seront reliées aux paramètres physiologiques analysées chez les animaux des espèces étudiées; 2) Réduire: si l'objectif de l'établissement d'une banque d'ADN est d'être aussi large que possible, seuls les individus présents dans l'EU seront utilisés afin de pouvoir corréliser données génétiques et physiologiques comme mentionnés précédemment ; 3) Raffiner: Le vétérinaire limitera les prélèvements aux animaux dont l'état de santé sera en adéquation avec la sévérité de la procédure expérimentale appliquée (prise de sang). A l'échéance de ce projet, il sera déterminé si celui-ci doit être poursuivi afin de collecter des échantillons complémentaires.

16588 Les cancers des Voies Aéro-Digestives Supérieures (VADS) sont classés au 7ème rang des cancers les plus fréquents. Leur mortalité et morbidité élevées, liées à des exérèses chirurgicales souvent étendues et aux effets secondaires de la radiothérapie, rendent nécessaires l'amélioration et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, la radiothérapie, indiquée chez environ 75% des patients atteints de ces cancers se complique principalement de xérostomie, encore appelée sécheresse buccale. Ainsi, cette xérostomie liée à l'irradiation des glandes submandibulaires (GSM) qui produisent la salive, altère significativement la qualité de vie du patient. Un des objectifs majeurs pour la prévenir est donc de protéger la GSM des effets néfastes de l'irradiation. Il a déjà été décrit des techniques de transposition de la GSM dans l'espace sous-mental ou encore en région parotidienne moins irradiée. Cependant, cette technique n'est pas applicable pour les cancers de la cavité buccale, qui représentent pourtant la localisation la plus fréquente des cancers des VADS (car l'espace sous mental est emporté dans le curage et irradié). Ainsi, il apparaît nécessaire d'identifier des zones peu voire non irradiées où pourrait être transposée la GSM, chez les patients atteints de cancers de la cavité buccale et de l'oropharynx et notamment en région sus-sternale. L'objectif de ce travail serait donc de transposer la GSM en région sus-sternale par une technique d'anastomoses microvasculaires. L'intérêt de tester cette technique sur l'animal et notamment le rat nous permettrait d'évaluer sa faisabilité et d'effectuer un protocole technique avant de l'appliquer chez l'homme dans l'espoir de réduire la xérostomie post irradiation dans les cancers de la cavité orale. Pour l'élaboration de ce projet, nous veillerons au respect de la règle des 3R.

Remplacer : nous avons réalisé une pré-étude sur une quinzaine d'animaux fraîchement décédés qui avaient été utilisés dans un autre projet afin de voir la faisabilité de la technique (repères anatomiques, dissections et sutures des vaisseaux et du canal).

Réduire : Le nombre d'animaux a été évalué de manière à utiliser le moins d'animaux possible tout en obtenant des résultats interprétables.

Nous avons évalué le nombre de rats à inclure à 40 rats : 20 rats pour la phase de mise au point de la technique et 20 rats d'étude permettant de rendre interprétable les résultats à long terme.

Raffiner : Pour éviter toute souffrance aux animaux, les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie pendant toute la durée de l'intervention. Une analgésie post-opératoire sera systématique pendant plusieurs jours. Une grille d'évaluation des points limites précise sera utilisée et le comportement des animaux sera surveillé quotidiennement pendant les 5 premiers jours afin de

détecter tout signe éventuel de douleurs. En cas de douleurs persistantes malgré l'utilisation d'antalgique, la mise à mort anticipée sera faite.

L'utilisation du modèle animal vivant est une étape nécessaire pour évaluer la faisabilité de la technique, la viabilité ainsi que la qualité fonctionnelle de la glande avant de pouvoir appliquer cette technique à l'Homme.

16589 La fracture osseuse est une pathologie très fréquente, son traitement repose sur la réduction du foyer de fracture puis sa contention jusqu'à cicatrisation osseuse (consolidation). La contention chirurgicale repose actuellement sur du matériel d'ostéosynthèse métallique de type plaque, vis et clou. Les cas de fractures comminutives sont particulièrement complexes en raison de la petite taille des fragments par rapport à la taille des vis elles-mêmes. Les tiers moyen et supérieur de la face offrent un bon exemple de ces fractures difficiles à fixer avec le modèle classique de plaques métalliques en raison de fractures généralement très comminutives dans un os fin et fragile. Par ailleurs les fractures intra-articulaires posent également un problème puisque le matériel peut interférer avec le fonctionnement de l'articulation.

Un adhésif ou « colle à os » offrirait une solution simple et rapide pour la prise en charge des fractures, tout particulièrement des fractures comminutives ou des fractures articulaires pour lesquels les systèmes actuels d'implants métalliques sont mal adaptés. Bio-résorbable, il permettrait d'éviter les complications liées aux implants métalliques et les nombreuses interventions réalisées pour retirer ce matériel, interventions liées à un risque de morbidité post-opératoire et à un poids économique certain.

Par ailleurs, les indications de la colle à os ne seraient pas limitées aux fractures d'origine traumatique, les fractures dirigées, comme par exemple en chirurgie orthognathique (chirurgie de repositionnement des mâchoires), pourraient également en bénéficier. Les fractures ne sont pas les seules interventions où une fixation osseuse est nécessaire. Les techniques d'autogreffes osseuses pour le comblement de pertes de substances osseuses ou à visée pré-prothétiques au niveau crano-maxillo-mandibulaire nécessitent la fixation des fragments osseux pour empêcher toute mobilité du greffon. La colle à os permettrait également dans ces cas d'obtenir la fixation nécessaire sans avoir à retirer de matériel par la suite.

En raison de ce contexte clinique et économique, notre équipe cherche à développer un matériau adhésif innovant. Les études mécaniques préliminaires sur os sec ont démontré une bonne efficacité de notre adhésif. De plus, une évaluation *in vitro* sur des cellules de la lignée osseuse n'ont pas mis en évidence de toxicité cellulaire. Il est toutefois nécessaire d'évaluer le comportement de l'adhésif dans un organisme vivant pour s'assurer de sa biosécurité et de sa biofonctionnalité.

Brièvement, cette étude consiste à créer une fracture du tibia sous anesthésie générale. La fracture sera réparée à l'aide soit de la colle à os, soit de façon conventionnelle par plaque et vis métalliques.

Nombre total d'animaux pour ce projet sera 120 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.

Remplacer : Les tests mécaniques préliminaires sur os sec nous ont permis d'optimiser la formulation de la colle à os. Seule la formule optimisée présentant la meilleure efficacité mécanique sera testée chez l'animal.

Raffiner : 1. Toutes les procédures seront effectuées sur des rats sous anesthésie générale. Les rats bénéficieront d'une injection préopératoire immédiate d'analgésique morphinique (buprénorphine 10 µg/kg, en injection sous cutanée). Tout au long de l'opération, les rats seront sous agent anesthésique gazeux continu (isoflurane), sur une plaque chauffante. Une anesthésie locale (infiltration de lidocaïne) sera réalisée avant l'incision chirurgicale sur le site opératoire. Les animaux recevront en postopératoire un traitement analgésique par morphinique (buprénorphine 10 µg/kg, en injection sous cutanée durant 72 h) et un régime normal ad libitum.

2. Au cours de l'étude, les rats seront observés et surveillés de près chaque jour à l'égard du bien-être animal. Dans le cas nécessaire, la décision d'un sacrifice sera prise et réalisée avant que les animaux souffrent.

3. De plus, la chirurgie est réalisée par du personnel formé et sensible aux règles d'éthique expérimentale.

Réduire : Deux méthodes de confirmation de l'efficacité sont nécessaires à 5 semaines avec un minimum de 20 animaux par sous-groupe mais seule une méthode sera utilisée à 3 mois. Cela permettra de démontrer avec une puissance statistique suffisante l'efficacité de la colle à os.

16590 Le gène étudié entraîne un syndrome de retard mental sévère associé à une diminution de la taille du cerveau, de l'épilepsie, des comportements autistiques et un déficit moteur.

Nous avons inactivé une copie de ce gène dans les interneurons GABAergiques de souris afin de d'analyser de manière spécifique le rôle de ce gène dans ces neurones. Cette inactivation entraîne des crises d'épilepsie spontanées ainsi qu'une diminution des interactions sociales chez les souris, confirmant le rôle du gène dans les interneurons pour les phénotypes associés au syndrome chez l'homme.

Pour ce projet, nous voulons déterminer quelle sous-population d'interneurones est impactée. Pour cela, nous avons choisi d'inactiver le gène dans les interneurons exprimant la parvalbumine (PV) car le dysfonctionnement de ces neurones est connu pour entraîner de l'épilepsie ainsi que des troubles de type autistique. Les souris seront hébergées par groupes de 4 individus dans un grand environnement d'hébergement et leur comportement social analysé par vidéotracking (LMT). Les souris auront ensuite un enregistrement électroencéphalographique (EEG) couplé à de la vidéo pour tester et évaluer leur susceptibilité aux crises épileptiques spontanées et des crises induites par une substance pro-convulsivante, le pentylène tétrazole (PTZ). Les animaux seront euthanasiés directement à la fin de ce protocole. Les tests seront réalisés sur souris adultes. Nous utiliserons pour cette étude 128 animaux au maximum sur 5 ans.

Remplacement : Nous utiliserons la souris en tant que modèle de ce syndrome car les déficits cognitifs en comportementaux observés chez l'homme ne peuvent être observés que sur un organisme vivant proche de l'homme. De plus, les modèles génétiques permettant d'obtenir une inactivation spécifique du gène dans les neurones PV n'existent que chez la souris.

Réduction : L'analyse de comportement social nécessite 16 souris par génotype afin de tenir compte de la variation comportementale inter-individuelle. Nous analyserons 4 génotypes (les souris contrôles non modifiées, les souris ayant le transgène permettant l'inactivation du gène dans les neurones PV, les souris avec le gène d'intérêt modifié permettant son inactivation et les souris ayant l'inactivation du gène dans les neurones PV). De plus, les mâles et les femelles n'ayant pas le même comportement social, l'analyse devra être faite sur les deux sexes. Nous aurons donc besoin de : $16 \times 4 \times 2 = 128$ souris.

Raffinement : L'analyse d'EEG nécessite une chirurgie. Celle-ci se fait sous anesthésie générale. Suite à l'opération, la souris est replacée dans une cage d'hébergement en position latérale pour éviter tout étouffement et maintenue à une température de 37-38°C. La souris est surveillée jusqu'à son réveil. Au réveil elle dispose de l'eau et de la nourriture « ad libitum » dans la cage. La souris sera surveillée pendant 48h après son réveil et en cas de douleur observée en post-opératoire, une injection de buprénorphine (analgésique) à 0.1mg/kg sera administrée en sous-cutané. Les enregistrements EEG sont faits à partir de 5 jours post-opératoire. Une injection de valium (antisédant) (10 mg/kg en IP) sera faite en cas de crise forte afin d'éviter la mort de l'animal.

16591 Les maladies parasitaires liées aux vers parasites touchent aussi bien l'Homme que les animaux. L'impact de ces vers parasites sur la santé animale est significatif puisqu'ils sont responsables de symptômes cliniques de type perte de poids, anémie, diarrhée voire la mort des animaux les plus atteints. L'utilisation massive de vermifuges a conduit à l'apparition de vers résistants aux traitements et rend actuellement le contrôle de ces parasites relativement limité pour l'élevage moderne conventionnel. Quant à l'agriculture biologique, elle favorise la mise en place de mesures de prévention

et proscrit en préventif l'utilisation de médicaments vétérinaires allopathiques chimiques de synthèse. Que ce soit dans l'un ou l'autre de ces systèmes de production, la santé des animaux peut être mise à mal par les parasites entraînant un mal-être important voire une souffrance dans les cas les plus extrêmes. Il est donc urgent de trouver de nouvelles solutions de contrôle efficaces, plus naturelles et respectueuses de l'environnement.

Pour cela, nous développons des projets de recherche qui visent à mieux comprendre la biologie du parasite ainsi que les mécanismes impliqués dans l'apparition de vers résistants mais également l'effet antiparasitaire de produits naturels. Au laboratoire, le modèle ovin est couramment étudié mais dans l'optique de tester de nouvelles molécules aux propriétés antiparasitaires, le modèle murin est très pertinent. En effet, après des tests *in vitro* de première intention (mise en évidence de produits actifs sur les stades libres du parasite) les preuves de concept peuvent être menées *in vivo* sur souris et ceci de manière beaucoup plus aisée que si l'on travaillait sur ovins (infrastructures, quantités de produits naturels à tester, approvisionnement en animaux, coût...). Nous avons donc mis au point un modèle murin sur lequel nous pouvons inoculer un nématode gastro-intestinal, *Heligmosomoïdes polygyrus bakeri*, phylogénétiquement proche des parasites ovins. Dans un second temps, les résultats pourront être généralisés à l'ensemble des trichostrongles avec un retour sur les espèces cibles.

Actuellement, les microalgues sont sujettes à un fort engouement en nutrition et santé humaine, par leur richesse en nutriments et l'effet avéré de certaines molécules sur la protection de l'organisme : activités anti-oxydante, antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire... Cet intérêt pour leur potentiel touche depuis peu le secteur de la nutrition animale. De plus, les effets bénéfiques de certains composés des micro algues sur la santé des organismes peuvent également constituer une alternative à l'utilisation des traitements médicamenteux en élevage. Cependant, les effets de l'introduction des micro algues dans la ration sur les performances et la santé des animaux d'élevage sont peu connus.

En première intention, une série de tests *in vitro* a permis de mettre en évidence une activité antiparasitaire de plusieurs extraits de ces micro algues. Dans un second temps, une étude préliminaire *in vivo* a été menée avec pour buts : de rechercher si les extraits interagissent avec la cible souhaitée/sur l'affection concernée et, le cas échéant, de déterminer le meilleur candidat parmi les 3 extraits sélectionnés *in vitro*.

Un effet antiparasitaire très marqué a été observé pour l'un des candidats ainsi qu'un effet moindre pour un deuxième extrait. Le protocole proposé ici est une étude complémentaire qui a pour objectif de voir si une combinaison de ces 2 extraits permet d'améliorer l'activité contre le parasite.

Deux critères seront évalués : - Effet sur les performances zootechniques (croissance des animaux dans un contexte infectieux) - Effet sur la sensibilité à un pathogène (niveau de contamination : nombre d'œufs de parasite excrété dans les fèces au cours du temps et/ou nombre de vers hébergés par la souris). Les effets seront étudiés par comparaison :

+ à un groupe recevant un aliment standard pour souris également soumis à l'infestation par le parasite.

+ à un groupe recevant un aliment supplémenté avec un seul extrait (Algue A ou Algue B)

+ à un groupe recevant un aliment supplémenté avec la combinaison ½ dose (½ Algue A + ½ Algue B)

Dans ce projet nous utiliserons des souris C57BL/6J mâles âgées de 3 semaines. Nous envisageons d'utiliser un total de 50 souris C57BL/6J pour cette expérience. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum. Il correspond au nombre minimal permettant d'obtenir des résultats significatifs avec les tests statistiques utilisés.

Remplacement : le ver parasite *Heligmosomoïdes polygyrus bakeri* est un parasite obligatoire dont le cycle de développement ne peut être réalisé *in vitro*.

Réduction : afin de minimiser au maximum les nombres d'animaux nécessaire, une série de tests *in vitro* a permis de sélectionner les extraits de micro algues les plus prometteurs (3 parmi 30 candidats) puis les 2 plus actifs *in vivo*, d'autre part la mise au point du modèle murin permet de limiter le recours aux ovins (les 2 parasites étant phylogénétiquement très proche)

Raffinement : les souris (5 par cage) sont hébergées en portoirs ventilés dans des cages contenant du sopalin pour enrichir le milieu (leur permettant de réaliser un nid). Elles seront suivies sur une base quotidienne. Si nous constatons des signes d'inconfort liés au traitement (trouble du comportement,

perte de poids supérieure à 20%...), les souris concernées seront immédiatement sorties de l'expérience.

16592 Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier chez la femme, à l'origine d'un peu plus de 11 800 décès par an en France. C'est une maladie complexe, il existe de nombreux sous types de tumeurs mammaires qui ont des profils histologiques, génétiques et génomiques variés expliquant une évolution clinique différente. Cette hétérogénéité constitue à l'heure actuelle un des freins majeurs à une prise en charge thérapeutique optimale des patientes. Le développement de modèles précliniques mimant la complexité de la maladie est donc indispensable pour définir au mieux le traitement de demain. De plus, 20 % des cancers du sein vont générer des récidives qui peuvent évoluer en maladie métastatique, un stade de la maladie actuellement incurable. Les principales cellules responsables de ces rechutes sont les cellules souches cancéreuses (CSC) qui ne sont pas affectées par les traitements conventionnels tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie.

Des travaux réalisés au laboratoire sur des lignées cellulaires *in vitro* ont déjà montré que la population de CSC augmente avec la radiothérapie. L'un des buts de cette étude est donc maintenant de confirmer *in vivo* l'augmentation de la proportion de CSC lors du traitement par radiothérapie et le cas échéant, de préciser la nature des CSC. Dans un deuxième temps nous souhaiterons tester de nouvelles thérapies capables de radio-sensibiliser la population de CSC (thérapie anti-CSC).

Ces essais précliniques seront réalisés à l'aide de modèles de xénogreffes de tumeur primaires chez la souris que nous avons précédemment développé à partir de tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein. Les animaux seront hébergés dans des salles dont les paramètres d'ambiance sont contrôlés (température : 20-22°C ; renouvellement d'air : 15 volumes/heure ; éclairage artificiel : 12h jour/12h nuit). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par petits groupes de 3 à 6 dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de copeaux de bois compactés et/ou de coton. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne par du personnel compétent afin de détecter précocement les points limites de souffrance. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- 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 les patientes.

- Réduire : A l'aide d'un calcul d'effectif, le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour permettre de fournir des résultats statistiquement significatifs.

- Raffiner : Afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Le suivi du développement tumoral se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés non invasifs : la mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse ou l'imagerie par bioluminescence. L'ensemble des procédures de transplantation et d'imagerie seront réalisées sous anesthésie associée, dans le cas de la chirurgie, à une analgésie afin d'éviter toute douleur. 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 du bien-être.

Ces études seront essentielles pour caractériser l'implication des CSCs dans les phénomènes de rechutes post radiothérapie mais aussi pour mettre en évidence l'efficacité thérapeutique de molécules capables de radio-sensibiliser la population de CSC et ainsi ouvrir la route à de nouveaux traitements cliniques du cancer du sein. Le projet nécessite 351 souris au total.

16593 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 toilette), 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.

16594 L'objectif de ce projet est scientifique et médical. La maladie de Parkinson est au second rang des maladies neurodégénératives après la maladie d'Alzheimer, affectant près de 1.8% des personnes âgées de plus de 65 ans à travers le monde. Il s'agit d'une maladie neurologique chronique dégénérative affectant le système nerveux central responsable de troubles progressifs, d'abord moteurs et sensoriels puis cognitifs. Malheureusement, à ce jour, les traitements disponibles soulagent de façon transitoire les symptômes et retardent l'évolution de la maladie de Parkinson mais ne permettent pas la guérison. Le projet de recherche que nous développons a pour objectif 1) de mieux comprendre les mécanismes cérébraux impliqués dans la régulation des symptômes moteurs et non-moteurs de la maladie de Parkinson et 2) de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Ce projet s'appuie sur une réflexion garantissant une mise en application dans le respect de la règle des 3Rs, à savoir raffiner, réduire et remplacer. Nous raffinerons nos expériences en prenant un soin particulier pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux tout au long du protocole expérimental. Par exemple, afin d'augmenter le bien-être des animaux, ceux-ci seront hébergés dans un environnement enrichi (matériel de nidification) et libre accès à l'eau et aux aliments. Durant la chirurgie et la période post-opératoire, la douleur sera prise en charge au moyen d'un anti-inflammatoire administré par voie systémique. De plus, nous avons défini des points limites (tels que la perte de poids et l'état général suite aux injections) pour l'ensemble de nos expériences pour anticiper et limiter le cas échéant les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser nos expériences, les animaux des deux sexes seront utilisés. De plus, chaque animal sera évalué dans plusieurs paradigmes comportementaux afin de recueillir le plus d'informations possible pour chaque cohorte expérimentale. De plus, ces animaux seront ensuite utilisés pour les analyses biochimiques ou immunohistochimiques. Enfin, l'utilisation d'outils statistiques nous permet de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des expériences.

Toutefois, 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.

La mise en oeuvre du projet de recherche nécessitera l'utilisation de 1036 souris sur 5 ans.

16595 Une des caractéristiques de la parole humaine est le fait qu'elle repose sur la reconnaissance des mots de la langue parlée, mots qui sont pour la plupart constitués d'un enchaînement d'unités sonores, appelées syllabes. Ces enchaînements ont un rôle essentiel : modifier l'ordre des sons d'un mot conduit à ce que l'on ne soit plus capable d'identifier les mots en question, que ce soit chez l'adulte ou l'enfant. Il se pose alors la question de savoir comment ces séquences de sons sont reconnues au niveau cérébral. Jusqu'à présent, les études faisant appel aux techniques d'imagerie cérébrale ont laissé en suspens la question des mécanismes mis en oeuvre. Dans ce cadre, les oiseaux chanteurs sont considérés comme un modèle animal d'étude des bases neurobiologiques du langage. Comme les humains, les chants qu'ils apprennent à produire sont des enchaînements de signaux sonores complexes, également appelés syllabes, dont la reconnaissance par les individus dépend de leur ordre d'enchaînement. Les oiseaux chanteurs possèdent de nombreuses régions cérébrales qui réalisent chacune des traitements auditifs complexes. Parmi les espèces d'oiseaux chanteurs, le canari domestique adulte a la particularité de produire des chants au sein desquels la façon d'enchaîner les syllabes est proche de celle utilisée pour constituer des mots (utilisation de probabilités de transition). C'est pourquoi, nous proposons d'étudier comment, chez le canari, les séquences de signaux auditifs sont traitées au niveau de deux régions-clé dans la perception et la production du chant. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, nous proposons de réaliser ces études chez des canaris adultes et chez des canaris juvéniles dans les semaines qui précèdent la maturité sexuelle, lorsque l'ordre d'enchaînements des syllabes est encore variable.

Au cours de nos expérimentations, nous recueillerons les chants produits par les oiseaux et nous enregistrerons l'activité des neurones auditifs ou audio-moteurs chez un total de 60 oiseaux (30 adultes

et 30 jeunes de 8-10 mois d'âge) libres de leur mouvement lors de la diffusion de différents types chants. Au cours d'études précédentes, nous avons déjà réalisé des enregistrements dans les deux régions qui nous intéressent et nous avons développé des collaborations avec des chercheurs qui développent des modèles computationnels. Ceci nous permet d'éviter les phases exploratoires, de limiter le nombre de questions que le thème soulève et de réduire le nombre d'oiseaux à celui qui nous permettra de collecter le nombre de données nécessaires pour obtenir suffisamment de puissance statistique. L'utilisation d'un système d'enregistrement multi-électrodes qui permet d'enregistrer simultanément l'activité de plusieurs neurones nous permet, de plus, d'obtenir un très grand nombre de données à partir d'un nombre réduit d'oiseaux. La procédure utilisée pour enregistrer l'activité neuronale chez l'oiseau vigile est très proche de celle utilisée chez les rongeurs. Un antalgique sera administré au cours des chirurgies et dans les jours qui suivent afin que celles-ci ne s'accompagnent pas de douleurs. L'étude du traitement des signaux de communication vocale nécessite que les individus soient dans les meilleures conditions. Pour cela, les oiseaux seront suivis quotidiennement.

16596 L'oxaliplatine est une chimiothérapie classiquement utilisée dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques et le traitement adjuvant du cancer du côlon au stade C de Dukes (après résection complète de la tumeur primitive). Le cancer colorectal étant le 3ème cancer le plus fréquent en France, l'oxaliplatine est largement utilisée, mais son efficacité s'accompagne d'une toxicité intestinale provoquant, entre autres effets secondaires, nausées et diarrhées (dans plus de 40% des cas), qui représentent une des causes majeures d'arrêt prématurés de traitements anticancéreux. Il est donc important de comprendre précisément les mécanismes d'action de l'oxaliplatine, afin de pouvoir enrayer ou limiter sa toxicité tout en préservant son efficacité.

Des données préliminaires de nos collaborateurs suggèrent un rôle de certaines bactéries intestinales sur les mécanismes d'action de l'oxaliplatine via la modulation de la production de mucus par les cellules épithéliales. Dans ce contexte, nous nous proposons d'améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la colonisation des bactéries favorisant la toxicité de l'oxaliplatine.

Durant ce projet, un maximum de 1152 souris sera utilisé pendant la période décrite de 24 mois, sous réserve de résultats prometteurs à confirmer par trois expériences indépendantes. Il s'agit d'un projet pilote qui sera étendu et redéposé si les résultats sont favorables et qui nécessitera plusieurs expérimentateurs. Ce nombre maximal d'animaux se justifie par les combinaisons de paramètres expérimentaux (comme l'heure d'administration) permettant l'étude des mécanismes d'intérêt.

Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. En particulier, les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Néanmoins, 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). Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux par le suivi de la consommation de nourriture et d'eau et la prise en considération de signes cliniques mesurables (respiration, poids corporel).

16597 Les synapses du système nerveux central, organisées en réseaux, assurent la transmission des informations dans le cerveau. Les protéines dites « d'échafaudage » sont essentielles au maintien de la stabilité structurelle et de l'excitabilité des synapses. En particulier, la protéine Shank3 joue un rôle clef dans la stabilité synaptique, puisqu'elle permet de maintenir un grand nombre de protéines au niveau de la post-synapse au sein d'un complexe fonctionnel. Il a été montré que des mutations de Shank3 chez l'Homme sont associées à des formes d'autisme. Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) représentent 2% de la population infantile et sont caractérisés entre autres par des déficits cognitifs et des stéréotypies. Au laboratoire, nous disposons d'une lignée de souris modèles d'autisme présentant une mutation de la protéine Shank3 : Shank3DC. Cette mutation invalide sa fonction, et les souris présentent des déficits comportementaux et des altérations de l'activité neuronale, déficits similaires à la présentation clinique de la maladie. Nous avons mis au point une stratégie permettant de rétablir le complexe fonctionnel, malgré la mutation de Shank3, via l'expression d'une protéine

chimérique. Nous avons pu montrer *in vitro* son effet bénéfique sur la localisation, l'activation des récepteurs et les voies de signalisation intracellulaire. Nous voulons maintenant étudier si l'expression de cette protéine chimérique peut rétablir les déficits comportementaux observés chez la souris Shank3DC.

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux car elle cible des mécanismes physiopathologiques complexes qui ne peuvent pas être récapitulés par des modèles plus simples (ex. culture de neurones). Nous avons appliqué la règle des 3R. Remplacer : Nous avons obtenu le maximum d'informations préliminaires sur l'efficacité de la protéine chimérique par expérimentation *in vitro* (culture cellulaire). Réduire: Nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle et au double emploi de certains animaux lorsque possible. Plusieurs informations seront obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal i) plusieurs comportements seront testés en série sur les mêmes groupes d'animaux ii) ces animaux seront utilisés pour des analyses histologiques post-mortem. Raffiner: Nous vérifierons aussi que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales qui garantissent le bien-être des animaux utilisés. Par ailleurs les tests comportementaux choisis n'impliquent aucune douleur ni stress pour l'animal. Nous estimons à 45 le nombre total de souris utilisées sur 1 an

16598 Les lymphomes sont des cancers du système immunitaire touchant dans la plupart des cas les ganglions. Le lymphome folliculaire est le lymphome indolent - c'est à dire à l'évolution lente et chronique - le plus fréquent. Il dérive des lymphocytes B - les cellules capables de produire les anticorps. Au cours de cette maladie les lymphocytes B tumoraux prolifèrent de façon anormale en s'accumulant dans les ganglions. Progressivement ces cellules disséminent dans l'organisme et la maladie se manifeste par un gonflement des ganglions. Le traitement repose aujourd'hui sur des protocoles d'immuno-chimiothérapie. Malheureusement, malgré les progrès thérapeutiques effectués, il s'agit d'une maladie incurable et chronique caractérisée par des phases de rémission plus ou moins longues, la maladie devenant progressivement résistante aux traitements. Les priorités actuelles sont de pouvoir identifier les patients à haut risque de progression rapide (20% des cas) dès le diagnostic et de mettre en évidence des facteurs prédictifs de réponse aux traitements. La compréhension des mécanismes biologiques sous-tendant la maladie constitue le pré-requis indispensable afin d'identifier de nouveaux marqueurs et des cibles pertinentes permettant de proposer des stratégies thérapeutiques innovantes.

Ce lymphome est issu de la transformation maligne des cellules du centre germinatif. Il est caractérisé par l'acquisition d'une anomalie chromosomique, la translocation t(14;18) – retrouvée dans 85% des cas. Cette signature génétique, spécifique de ce type de lymphome, constitue l'événement initiateur nécessaire et non suffisant à la survenue de la maladie. Des mutations conduisant à l'inactivation d'un gène appelé KMT2D, codant pour une enzyme impliquée dans la régulation de l'expression des gènes, ont été décrites dans plus de 80% des cas. On sait que ce gène agit comme un suppresseur de tumeur au niveau des lymphocytes B en régulant de nombreuses fonctions cellulaires. Toutefois, les conséquences qui en résultent ne sont pas complètement élucidées. Etant donnée la fréquence élevée des altérations de ce gène dans le lymphome folliculaire, il est fondamental de décrire précisément les anomalies moléculaires qui en découlent afin de mettre en évidence le talon d'Achille de ce cancer. Nous proposons dans ce projet de mettre au point d'un modèle murin récapitulant les étapes de lymphomagenèse du lymphome folliculaire afin ainsi d'étudier le rôle des altérations de KMT2D au cours du processus de cancérisation *in vivo* chez la souris.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement : Il n'existe à ce jour aucune alternative à l'expérimentation animale lorsqu'il s'agit de modéliser le processus complexe de lymphomagenèse. En effet le lymphome folliculaire humain est dépendant d'une interaction forte avec un micro-environnement spécialisé, celui-ci évolue de façon dynamique au cours de la progression tumorale et de l'accumulation d'événements génétiques secondaires. Nous souhaitons récapituler l'ensemble de ces étapes jusqu'à la progression tumorale dans un modèle murin original permettant de mimer la cinétique d'apparition des événements à un temps donné (moëlle osseuse et centre germinatif), dans une cellule donnée (lymphocytes B) et uniquement dans une certaine proportion des cellules reproduisant le développement précoce chez

l'homme. Deux feuilles de route récentes (Weinstock et al. Blood 2015, Engert et al. Haematologica 2016) établissant les priorités dans le domaine de la recherche translationnelle en hématologie soulignent l'importance actuelle des modèles *in vivo*.

Rafinement : Toutes les procédures expérimentales du projet sont réalisées en tenant compte du bien-être animal dans le strict respect des réglementations en vigueur et en étroite collaboration avec la structure du bien-être animale de notre établissement. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'anxiété subie par les souris afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal être" de l'animal. Une anesthésie générale sera utilisée durant les procédures expérimentales (prélèvement sanguin et transplantation). Nous vérifierons l'état de santé des souris quotidiennement : tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation) sera relevé et évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort. Durant l'ensemble de l'étude, les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlé : température et ventilation régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie), avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Les souris seront maintenues en groupes de 3 à 5 animaux par cage. L'environnement est enrichi par des dômes en carton ou du coton.

Réduction : Le design du projet a été réalisé de façon à répondre à notre objectif avec le nombre minimal nécessaire de souris.

Remplacement: Dans la problématique d'obtenir des échantillons de patient (nécessitant des prélèvements invasifs), l'utilisation de modèles animaux est indispensable. Ne pouvant donc pas remplacer le modèle murin, nous réduisons autant que possible leur utilisation.

Le nombre d'animaux nécessaires pour l'expérimentation sur 5 ans s'élève à 1016 animaux.

16599 La nicotine, principale substance addictive du tabac, agit sur le cerveau en se liant à des récepteurs appelés récepteurs nicotiques, ce qui induit une modification de l'activité électrique des neurones. Ces récepteurs nicotiques sont normalement activés par un messenger produit par le cerveau : l'acétylcholine. Il existe de nombreux types de récepteurs nicotiques neuronaux, qui sont distribués dans l'ensemble du cerveau et ont des fonctions biologiques variées. La nicotine va donc prendre la place de l'acétylcholine et avoir des effets physiologiques différents selon les zones du cerveau sur lesquelles elle agit, mais aussi en fonction des récepteurs nicotiques qu'elle active. Identifier et comprendre le rôle spécifique de chaque type de récepteur et de chaque région du cerveau lors des différentes phases de l'addiction (mise en place, consommation, manque, rechute...) est donc crucial à la compréhension des mécanismes de la dépendance à la nicotine et au développement de nouvelles thérapies.

A cette fin, nous développons des techniques innovantes qui permettent de contrôler les récepteurs nicotiques du cerveau en utilisant la lumière comme stimulus à la place de la nicotine. Cette technologie permet d'utiliser la lumière pour photo-contrôler le récepteur modifié dans une région ciblée du cerveau avec une très grande précision pharmacologique, spatiale et temporelle.

Le but de ce projet est d'utiliser des récepteurs nicotiques photo-contrôlables chez la souris *ex et in vivo*, afin de 1) comprendre comment l'acétylcholine endogène module les circuits neuronaux de l'addiction à la nicotine ; 2) comprendre comment la nicotine détourne le fonctionnement normal de ces circuits 3) manipuler, avec la lumière, des comportements associés à l'addiction à la nicotine, tels que le renforcement.

Pour cela nous utiliserons des souris normales et des souris transgéniques qui permettent d'affiner l'étude. Notamment, certaines souris permettent de cibler l'expression des récepteurs modifiés dans un sous-type de neurone ; ces souris sont classiquement utilisées dans les laboratoires et n'ont aucun phénotype dommageable. Nous utiliserons également des souris transgéniques récemment produites par le laboratoire, qui permettent de contrôler l'activité des récepteurs nicotiques endogènes de la souris. Ces souris consistent en une mutation ponctuelle des gènes codant les récepteurs nicotiques, mutation qui permet de rendre le récepteur photo-contrôlable, mais qui ne modifie pas son

fonctionnement normal. Ces souris n'ont pas encore été phénotypées, mais nous n'anticipons pas de phénotype dommageable.

Pour l'ensemble des conditions, nous estimons que nous utiliserons 500 animaux pour ce projet qui s'étend sur 5 ans. La nécessité de travailler sur animaux vivants s'explique par le fait que la nicotine agit de concert sur un ensemble de circuits neuronaux distincts, mais néanmoins connectés. De plus, les comportements addictifs tels le renforcement, la consommation ou l'aversion ne peuvent s'étudier que chez l'animal vivant. Le choix des souris se justifie par la présence d'un circuit de l'addiction (notamment un réseau dopaminergique et cholinergique) très similaire à celui de l'Homme, ce qui n'est pas le cas chez les invertébrés, les poissons ou les oiseaux. Enfin, la génétique de la souris offre des outils de modulation du réseau neuronal, ce qui est difficilement accessible chez d'autres animaux. Les groupes d'animaux testés seront définis de manière à réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats robustes, dans les différentes conditions. Les animaux sont stabulés dans les conditions préconisées dans l'annexe A de la convention européenne sur l'hébergement des animaux de laboratoire (directive 2010/63/EU annexe III). Tous les actes chirurgicaux sont effectués sous anesthésie générale, et des antalgiques sont utilisés en pré- et post-opératoire, afin de minimiser la douleur chez l'animal. Dès la phase post opératoire, jusqu'à la fin des expériences, chaque animal est examiné quotidiennement. L'ensemble de ces propositions vise donc à respecter le principe des 3Rs.

16600 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative aussi fréquente que la sclérose en plaques. Son issue est fatale en quelques années après le diagnostic, par paralysie progressive provoquant une insuffisance respiratoire. Une partie des cas de SLA est d'origine familiale (SLAF), le plus souvent de transmission autosomique dominante. La SLAF est une maladie hétérogène, et des mutations dans plus de 10 loci sont actuellement connus pour provoquer la SLAF. Nous disposons au laboratoire de deux modèles conditionnels de la maladie, basés sur des mutations des gènes *SOD1* et *Fus*. Ces modèles permettent d'évaluer l'importance d'un type cellulaire donné dans la maladie.

Au cours de la SLA, la jonction neuromusculaire, la zone de contact entre le neurone moteur et la fibre musculaire, est la première structure à être affectée. De plus, des données de notre laboratoire démontrent d'ailleurs l'existence de défauts musculaires au cours de la maladie qui pourraient contribuer à la perte des neurones moteurs observée chez les patients et les modèles animaux. Bien que la SLA soit actuellement décrite comme une maladie multicellulaire, l'implication du muscle dans la pathologie reste à éclaircir.

Notre objectif ici est donc d'étudier la contribution du muscle squelettique dans le phénotype des modèles de SLA. Pour cela, nous abolirons l'expression des transgènes sélectivement dans le muscle squelettique.

Nous étudierons 256 souris, de 8 génotypes différents (32 souris par groupe ; *SOD1*, *Fus*, avec ou sans ablation sélective du transgène dans le muscle et leurs contrôles respectifs). Les capacités motrices des souris seront évaluées au cours de la pathologie et les tissus prélevés seront consacrés pour moitié à des études histologiques et pour moitié à des études moléculaires.

128 souris permettront le maintien des trois lignées transgéniques nécessaires à l'étude. Cette étude nécessitera donc au total 384 souris.

Conformément à la règle des 3 R :

- 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.

- 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. Nous avons Remplacé, dès que possible, le modèle animal par un modèle cellulaire.

Cependant, pour la compréhension du mécanisme complexe que nous étudions, le modèle animal reste indispensable. La plupart de nos expériences ne peuvent être remplacées par des manipulations de culture cellulaire du fait de la complexité de la maladie.

- Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions d'hébergement conformes à la réglementation en vigueur. Nous avons amélioré leur bien-être (Raffinement) en procédant à un enrichissement de leur milieu de vie (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. Enfin, nous avons réduit le stress procuré à l'animal en limitant le bruit dans l'animalerie et en les manipulant avec calme et soin.

16601 Les pertes d'os alvéolaire (l'os dans lequel sont insérées les dents) peuvent être secondaires à une infection (parodontite), un traumatisme, une tumeur ou une absence de dent. L'absence de dent d'origine congénitale ou secondaire à une extraction se complique d'un manque d'os alvéolaire. Cette perte d'os alvéolaire peut empêcher la mise en place d'implant dentaire par manque de tissu osseux, rendant impossible l'ancrage de l'implant. Dans cette situation clinique il est souvent nécessaire d'utiliser des dispositifs médicaux pour régénérer l'os manquant, avant de placer un implant. Les dispositifs médicaux utilisés reposent sur :

- des matériaux de comblement qui remplacent l'os ou favorisent la régénération osseuse
- des membranes qui isolent la lésion osseuse du tissu mou environnant, empêchant ainsi que les cellules du tissu mou entrent en compétition avec les cellules osseuses

Le développement d'un dispositif médical pour régénérer l'os alvéolaire se fait en respectant une procédure hiérarchisée qui va de l'évaluation *in vitro* (physico-chimie, cultures cellulaires) à l'évaluation *in vivo* sur le petit puis le gros animal et enfin des études cliniques spécifiques.

Nous proposons dans ce projet de réaliser des modèles pré-cliniques, déjà décrits, de lésions osseuses standardisées chez le rat, au niveau du palais à l'arrière des incisives, afin d'évaluer des matériaux de régénération osseuse et des membranes innovants.

Les produits destinés à être implantés chez l'humain doivent nécessairement être testés chez l'animal avant les essais cliniques. Il n'existe pas de méthode basée sur une approche *in vitro* permettant d'évaluer ces matériaux (pas de Remplacement possible). Les matériaux doivent être d'abord testés dans modèle de rat, puis, si les résultats obtenus sont satisfaisants, ils doivent être testés dans modèle chez le gros animal. Les procédures chirurgicales se feront dans le respect du bien-être animal, en minimisant le nombre d'animaux utilisés grâce à la mise en oeuvre d'un suivi dans le temps par imagerie (Réduction), en optimisant les procédures anesthésiques, antalgiques, chirurgicales et de suivi. Les rats seront maintenus par groupe de trois avant l'opération et regroupés 5 jours après celle-ci, de façon à favoriser les interactions sociales importantes pour le bien-être de ces animaux (Raffinement). La douleur sera prévenue par l'utilisation d'antalgiques avant l'opération.

Nous avons choisi comme modèle de petit animal le rat car il a été abondamment décrit dans la littérature scientifique et permet une première évaluation du matériau. La chirurgie sera précédée de l'injection d'un analgésique pour limiter la douleur. Elle sera effectuée sous anesthésie profonde, et un analgésique local sera injecté (comme pour les interventions des dentistes chez l'humain) afin de réduire encore la douleur. Les animaux seront surveillés pendant 5 jours suivant l'expérimentation par les personnels de l'animalerie qui préviendront éventuellement le chirurgien pour intervention en cas d'infection (utilisation de biseptine), de problème avec les points de suture (reprise éventuelle de celles-ci) ou de douleur (administration d'un antalgique). Afin de réduire le nombre d'animaux, nous aurons recours à l'imagerie scanner de façon à suivre l'évolution du processus de formation osseuse, évitant

ainsi d'avoir à sacrifier des animaux à des temps intermédiaires pour analyser ces processus. Ce n'est que lorsque le processus de formation osseuse aura été observé par scanner que les animaux seront euthanasiés pour terminer l'expérience par des études d'histologie. Le nombre total d'animaux prévus pour 5 ans est de 280.

16602 Le cancer est la deuxième cause de décès parmi toutes les maladies. La résistance au médicament est l'une des principales causes d'échec des traitements actuels. La nanomédecine est une stratégie prometteuse pour surmonter la résistance aux médicaments, et en même temps réduire la toxicité et améliorer l'efficacité thérapeutique. Le cancer du pancréas est un cancer très meurtrier. Asymptomatique et métastatique, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace, l'espérance de vie du patient excède rarement 6 mois. Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez les femmes. Bien que de progrès importants aient été réalisés dans son traitement, le cancer du sein triple négatif (TNBC) est agressif et de mauvais pronostic. Le traitement principal contre TNBC non-sécable est la chimiothérapie conventionnelle. Mais malheureusement, les patients développent une résistance à cette intervention, ce qui rend le traitement difficile. L'urgence à laquelle la recherche est confrontée nous a amené à développer de nouveaux agents efficaces basés sur la nanotechnologie pour combattre le cancer du pancréas et du sein (TNBC).

Après une étude minutieuse *in vitro* (in cells, in 3D-spheroids), une nano-formulation de Rapamycin par les dendrimères amphiphiles a été sélectionnée et s'est avérée très efficace sur différentes cellules cancéreuses. Nos résultats préliminaires sur des souris xénotransplantées de tumeurs du pancréas sont aussi très prometteurs. Ainsi, pour vérifier si cette nano-formulation est efficace pour différents modèles de cancer du pancréas et également pour d'autres types de cancer, nous voulons valider son activité anticancéreuse avec plusieurs modèles de cancer comme les cancers du pancréas et du sein (TNBC) dans ce projet. A l'heure actuelle, il n'existe aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce type d'étude. Le modèle animal le plus pertinent à ce jour reste la souris. Dans ce projet, des souris xénotransplantées de tumeurs du pancréas et du sein triple négatif (TNBC) humain seront utilisées pour valider l'efficacité de cette nano-formulation Rapamycin/dendrimère afin d'évaluer son potentiel contre ces cancers. Le projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R. Dans le respect des principes de remplacement et de réduction, nous avons déjà testé notre nanoformulation *in vitro* (cellules tumorales dérivées de patients en culture).

Mais, l'étude *in vitro* doit être complétée par des études *in vivo* pour la validation. Nos études préliminaires *in vivo* sont prometteuses, mais doivent être complétées par les différents modèles tumoraux pour assurer un intérêt réel vers le transfert de ces recherches en clinique. Dans le respect du principe de réduction du nombre d'animaux, nous les réduirons grâce à l'utilisation de tests statistiques permettant d'optimiser la taille des effectifs. Le nombre total d'animaux pour ce projet est estimé à 488 souris: 80 souris NSG pour générer les xénotransplantées qui vont ensuite être implantées sur les souris NUDE, et 408 souris NUDE xénotransplantée pour évaluer l'efficacité et la biodistribution de la nanoformulation Rapamycin/dendrimères sur les 4 modèles de cancer issus de 2 lignées cellulaires du cancer du pancréas (02.083p et AH-IPC) et 2 lignées cellulaires du TNBC (MDA-MB-231 et MDA-MB-436). Dans le respect du principe de raffinement, l'implantation des tumeurs comme le traitement par la nanoformulation et la procédure d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale en voie gazeuse afin de réduire le stress et la douleur des animaux. Si l'état de la souris nécessite une prise d'antalgique, nous lui donnerons de la buprénorphine à 0,1mg/kg. Nous utiliserons des doses à faible impact neurologique afin de préserver le bien-être des animaux tout en évaluant l'efficacité de notre nano-formulation. Les animaux seront surveillés au quotidien pour détecter le moindre signe de souffrance. Des points limites et des grilles de score sont prévus et seront suivis afin de garantir le bien-être animal. Une échelle clinique adaptée au modèle tumoral d'implantation sous-cutanée permettra de suivre chaque animal et de détecter des signes de souffrance. Les animaux seront soit mis à part pour récupérer leur état normal soit euthanasiés dès qu'ils atteindront un score clinique limite, ou qu'un signe clinique critique est atteint. De plus, un délai d'acclimatation minimum de 7 jours et une habitude à l'expérimentateur seront assurés pour les animaux, et les conditions d'élevage seront optimisées pour réduire le stress des animaux au minimum (présence de rouleaux de papier dans les cages pour se blottir, constitution de petits groupes sociaux afin d'éviter le stress de l'isolement,

maximum de 4 - 5 souris par cage). L'ensemble de ces mesures conduira à favoriser au maximum le bien-être des souris.

16603 Chez l'Homme, comme chez la souris, on observe une accumulation de cellules dites « sénescences » avec l'âge. Ces cellules « séniles » sont incapables de proliférer et libèrent des molécules pouvant être néfastes pour les cellules voisines. Leur accumulation empêche le renouvellement et la réparation des organes chez l'individu âgé. Un grand nombre d'études montrent que l'accumulation de cellules sénescences pourrait être la cause du vieillissement et de nombreuses maladies liées à l'âge, en particulier les maladies pulmonaires.

La communauté scientifique a mis en évidence les mécanismes d'apparition des cellules sénescences : au cours des multiplications cellulaires successives, on observe un raccourcissement des extrémités des chromosomes, appelées télomères. Lorsque les télomères sont très courts, la cellule entre en sénescence. Seule une protéine appelée télomérase est capable de rallonger les télomères, mais elle n'est pas présente chez les cellules adultes.

Notre laboratoire étudie le rôle des télomères et de la télomérase au cours du vieillissement. Nos résultats obtenus chez la levure mettent en évidence un rôle complexe de la télomérase en dehors des télomères.

Le but de cette étude est d'étudier la longueur des télomères au cours du vieillissement dans plusieurs organes, et le rôle de la télomérase. Nous étudierons ces organes dans différentes situations, mimées par 4 lignées de souris génétiquement modifiées pour exprimer des niveaux différents de télomérase. Nous utiliserons pour cela 128 souris dans ce projet. Ce projet nous permettra de mieux comprendre les mécanismes du vieillissement et de la survenue de cancer avec l'âge.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé au plus juste en tenant compte de l'expérience acquise au laboratoire en termes d'incidence des maladies pulmonaires chez la souris et de mise en évidence d'effet significatif du vieillissement sur les paramètres histologiques mesurés en fin d'expérience. De plus, nous utiliserons une technique d'imagerie afin de suivre l'expression tissulaire de la télomérase transgénique d'une souris en réponse à un traitement afin de réduire la taille des groupes.

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour éviter la souffrance des animaux.

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. De plus, les animaux seront surveillés quotidiennement pour l'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance à l'aide d'une grille de score du bien-être animal.

- Remplacement : Ce projet est basé sur des résultats obtenus chez la levure, qui nous ont permis de comprendre certains mécanismes mis en jeu au cours de la sénescence. Néanmoins, le vieillissement est un mécanisme complexe. L'utilisation d'animaux est indispensable pour obtenir des résultats complets à l'échelle d'un organe.

16604 Les salmonelles sont responsables, suivant leur hôte, de pathologies très différentes allant de la fièvre typhoïde à la gastroentérite en passant par le portage asymptomatique. La principale source de contamination humaine dans les pays industrialisés est les volailles contaminées. L'identification des animaux porteurs de Salmonella est donc une priorité en terme de sécurité sanitaire des aliments. Chez les volailles, la majorité des sérotypes de salmonelles (Typhimurium et Enteritidis) induisent un portage asymptomatique qui correspond à une infection systémique transitoire et à une persistance de la bactérie dans les caeca accompagnée d'une forte excrétion fécale sans trouble pour l'animal.

Les mécanismes à l'origine de ce portage sont très mal connus. Ils font intervenir de nombreux facteurs : bactériens (facteurs de virulence), de l'hôte (facteurs immunitaires), de la flore intestinale et de l'environnement. L'existence de recontaminations entre animaux est connue et nous avons montré récemment qu'elles jouaient un rôle capital dans l'établissement du portage.

Pour démontrer cela nous avons développé deux modèles d'infection des poussins par Salmonella : un modèle en isolateur où les recontaminations entre animaux sont très faibles et un modèle plus conventionnel, en cage, où les recontaminations entre animaux sont fortes. Les premiers résultats suggèrent que le portage de Salmonella est lié à la présence d'animaux super-excréteurs qui recontaminent les autres animaux plus résistants à une première infection.

L'objectif de ce projet est d'identifier les facteurs bactériens, de l'hôte et de sa flore intestinale qui sont responsables de l'infection et du statut « super et faible excréteur » des poussins suite à une première inoculation. Nous étudierons également le rôle de ces facteurs dans la transmission entre animaux ainsi que des moyens de lutte contre l'infection des poulets. Le projet inclut des infections en isolateur et des infections en cage ou au sol. Dans ces modèles, des animaux jeunes (entre 1 et 7 jours) sont inoculés par voie orale, voire en intrapéritonéale ou en intraveineuse, avec une suspension de salmonelles. Le niveau de colonisation est contrôlé par des prélèvements réguliers et individuels de fientes. L'inoculation préalable par voie orale, intrapéritonéale ou intraveineuse de vaccins, de produits biologiques (probiotiques ou phages) ou de drogues capables de moduler les facteurs de l'hôte ou le microbiote intestinal est prévue. En fin d'étude les animaux sont autopsiés et des dénombrements bactériens sont réalisés dans les organes cibles (rate, foie, caeca, intestin). Des prélèvements de sang sont possibles dans certaines expériences. En fonction du modèle et du paramètre étudié, la durée d'expérimentation varie entre 3 et 35 jours post-inoculation.

La règle des trois R est appliquée :

- Remplacement : l'étude du portage bactérien ne peut se faire que par le biais d'étude *in vivo* sur animaux cible. Dans la mesure du possible une caractérisation préalable des gènes bactériens et de la réponse de l'hôte est réalisée *in vitro* sur lignée cellulaire pour permettre la sélection des gènes les plus pertinents.

- Raffinement : Les animaux seront hébergés dans les isolateurs, au sol ou dans des cages en groupe, aliment et eau ad libitum et éclairage 12/24h. Les animaux bénéficieront d'un enrichissement environnemental et matériel. L'espace de vie sera enrichi par la suspension d'objets métalliques permettant d'occuper les animaux et de diminuer le piquage entre animaux. En fonction des avancées techniques, il pourra être envisagé de suivre la colonisation des organes par les techniques d'imagerie *in vivo*. Cinq expériences par an sont planifiées afin de tester les différents paramètres qui pourraient être impliqués et les actions de contrôle, des points limites ont été mis en place pour palier à d'éventuelles souffrances selon les procédures.

- Réduction : Le nombre de poussins à utiliser par expérimentation est fixé en fonction du test statistique. Dans les cinq années à venir, le projet utilisera 3255 poussins. La majorité de ces expériences ne devraient pas induire de douleurs

importantes à l'animal puisque nous travaillons sur un portage asymptomatique mais les études précédentes ont permis d'adapter et d'optimiser le nombre d'animaux utilisés.

16605 La diminution d'efficacité des antibiotiques, du fait des résistances bactériennes qui se développent, oblige à mieux utiliser les antibiotiques notamment en administrant des doses optimales c'est-à-dire suffisantes pour permettre la guérison sans contribuer à une surconsommation des antibiotiques en médecine vétérinaire. Pour ajuster les doses, il faut connaître les concentrations qui arrivent au site infectieux après une administration par voie orale (voie d'administration utilisée en élevage, notamment via l'eau de boisson) et donc réaliser des études pharmacocinétiques.

L'objectif de ce projet est de déterminer chez le porcelet en post-sevrage les paramètres pharmacocinétiques et l'absorption par voie orale de deux antibiotiques administrés fréquemment en élevage via l'eau de boisson : la doxycycline et l'amoxicilline. Une administration intraveineuse de ces deux antibiotiques sera également réalisée afin de déterminer leur biodisponibilité par voie orale, c'est-à-dire la portion d'antibiotique atteignant la circulation sanguine. En effet, cette portion est de 100% par voie intraveineuse. En comparant l'évolution des concentrations plasmatiques au cours du temps après une administration de la même molécule par voie orale et par voie intraveineuse, il est alors possible de déterminer la portion de cette molécule atteignant la circulation sanguine après la voie orale.

Pour déterminer la biodisponibilité d'une molécule, il est préférable que les administrations intraveineuses et orales soient faites sur le même lot d'animaux. Cela nous permet alors de réduire le nombre de lot d'animaux à deux lots: 6 porcs recevant la doxycycline et 6 porcs recevant l'amoxicilline d'abord par voie orale puis par voie intraveineuse. Le porc est l'espèce cible pour laquelle les traitements antibiotiques souhaitent être optimisés. Le nombre d'animaux par lot est le nombre minimal calculé à partir de données bibliographiques obtenues sur la cinétique de ces antibiotiques. 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 (absorption, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale...).

Les porcs seront hébergés en groupe par lot. Les boîtes de chaque lot seront équipées de balles à mâcher suspendues à des chaînes en inox et de ballons. Pour limiter le stress des animaux et faciliter notamment les administrations par voie orale, ils seront entraînés à la manipulation avant la réalisation du projet et du sirop de cassis leur sera donné comme "récompense" via des seringues prolongées d'un embout de sonde gastrique. Les administrations par voie intraveineuse seront réalisées via un cathéter posé dans une des veines de l'oreille sous anesthésie. Après les administrations par voie orale et par voie intraveineuse, des prises de sang répétées seront réalisées sur les animaux sans dépasser au maximum 4 à 8% de la volémie totale pour un porc de 10 à 20 kg prélevés sur 2 semaines.

16606 La syphilis, infection sexuellement transmissible, connue en Europe depuis cinq siècles avait pratiquement disparue, dans les pays développés, avec l'usage de la pénicilline. Or, depuis les années 2000, une recrudescence de son incidence est observée et estimée à plusieurs milliers de cas chaque année en France, tout particulièrement dans la population des hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes. Cette pathologie peut affecter tous les organes et avoir de graves conséquences si elle n'est pas dépistée et traitée.

La syphilis est due à *Treponema pallidum*, bactérie spirochète, observée au microscope au début du siècle dernier, mais qui n'a jamais été mise en culture.

Depuis un an, notre équipe tente la culture ultrapure de l'agent de la syphilis (*T. pallidum*) dans un milieu axénique (en absence de tout autre organisme, dans un milieu stérile, exempt de tout autre agent biologique). Les résultats obtenus, s'ils montrent que des cultures restent positives au test moléculaire (détection de l'ADN) de réaction de polymérisation en chaîne (PCR), ne peuvent pas objectiver la viabilité des éventuelles bactéries cultivées. Le passage à l'essai *in vivo* chez le lapin (seul connu pour être un bon modèle) et la tentative d'infection de la souris deviennent une étape obligatoire d'une recherche scientifique, qui une fois que la culture axénique de *T. pallidum* sera maîtrisée, s'abstiendra d'avoir recours à l'expérimentation animale. Des animaux destinés à la recherche seront donc utilisés, de manière ponctuelle, dans ce projet. Pour l'exploitation des données qui seront recueillies, il faudra au maximum 50 sujets (20 lapins et 30 souris) pour atteindre les objectifs de l'étude. Cependant, pour réduire le nombre des animaux utilisés, des expériences préliminaires seront réalisées sur un nombre restreint d'animaux puis selon les résultats le nombre d'animaux sera augmenté lorsqu'un effet semblera exister afin de répondre à l'objectif de l'étude.

Par ailleurs, les animaux bénéficient d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des études. Pour les souris, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles sont assurés entre congénères car leur hébergement sera par groupe de 5 dans des cages contenant plusieurs tunnels et éléments à ronger. Des dômes seront installés pour qu'ils puissent s'isoler s'ils le souhaitent. Des éléments à ronger sont fournis aux lapins afin qu'ils puissent se divertir. Les lapins seront hébergés dans des cages individuelles munies d'une plateforme non métallique répondant aux normes.

16607 L'état des lieux des ruisseaux en tête de bassin versant dans le département du Haut-Rhin a débuté en 2019 (dite étude RTB). En effet, ces cours d'eau contribuent de façon importante au bon fonctionnement écologique et hydrologique d'un point de vue quantitatif et qualitatif : soutien au débit d'étiage, recharge des nappes, recyclage et stockage des éléments nutritifs, habitats d'espèces patrimoniales (Écrevisse à pattes blanches, Chabots, ...). Sur ces milieux, des objectifs de restauration

de leur fonctionnalité existent (Directive Cadre sur l'Eau) et nécessitent pour cela d'identifier les points noirs environnementaux afin de proposer des solutions à ces derniers (travaux).

En parallèle, il a été décidé de coupler cette étude hydromorphologique à des pêches scientifiques qui permettront de définir les peuplements piscicoles en place, les densités des populations de truite fario mais aussi leur taux de croissance et leur origine. Cette dernière, qui fait l'objet du présent dossier, a plusieurs objectifs, à terme, au niveau départemental puisque chaque bassin du Haut-Rhin bénéficiera de cette étude :

1. Réactualiser les connaissances concernant la distribution actuelle de la truite fario dans le département ;
2. Evaluer les impacts de la fragmentation du continuum aquatique sur la génétique des populations ;
3. Estimer le degré de naturalité des populations sur la base des taux d'introgression de gènes exotiques ;
4. Proposer, si nécessaire, des mesures de gestion appropriées aux caractéristiques génétiques des populations en place.

En effet, actuellement, les associations de pêche, pour pallier aux modifications et pollutions historiques et développer leur loisir, pratiquent le soutien de peuplement en introduisant des individus de truites fario, provenant de pisciculture. Ces introductions peuvent donner lieu à la prédation des juvéniles nés dans le milieu naturel par les truites non autochtones mais aussi que ces dernières transmettent leurs gènes, non adaptés au milieu, et signe la perte des populations naturellement en place. Les résultats d'études similaires, sur d'autres départements, ont permis, à terme, d'obtenir une population en adéquation avec son milieu et d'arrêter toute introduction de nouvel individu ou de les limiter à des introductions de poissons autochtones.

L'acte pour le prélèvement génétique nécessite une anesthésie pour le confort de l'individu et limiter le stress (Raffinement). Les fortes chaleurs seront évitées et les manipulations se feront toujours en milieu humide (mains du manipulateur mais aussi la zone de l'opération). Les poissons en attente de l'opération mais aussi après celles-ci sont stockés dans des viviers placés au sein du cours d'eau, soit dans leur milieu de vie pour une récupération optimale. La clé pour limiter le stress est la rapidité de l'opérateur, c'est pourquoi seul un professionnel ayant suivi des formations spécifiques sera amené à manipuler les poissons. Une partie de sa nageoire pelvienne gauche prélevée (5 mm sur 5 mm). Le choix s'est porté sur cette nageoire car, à l'instar des autres, sa repousse est prouvée, c'est celle la plus fréquemment utilisée et qui a été conseillée pour cette étude. Le rôle de cette nageoire paire (une sur le flanc droit et une à gauche) est la stabilité du poisson. Etant au nombre de deux, l'imputation d'une petite partie n'entrave pas les mouvements de l'individu une fois prélevé. Le choix de la nageoire gauche est arbitraire et est uniquement dû dans un souci de reconnaissance d'un individu déjà marqué (seule la nageoire pelvienne gauche est à vérifier). L'individu sera également mesuré et pesé (biométrie). Ceux mesurant moins de 10 cm sont exclus du protocole, l'imputation d'un tel morceau de nageoire pouvant s'avérer trop invasif. Au total, ce sont 10 stations où 30 individus seront prélevés, indiqué dans les protocoles fournis par notre prestataire pour l'analyse génétique, le bureau d'étude SCIMABIO Interface comme étant le nombre minimum d'échantillon pour obtenir des résultats robustes (soit seulement 300 individus, Réduction) et, après réveil, seront tous relâchés dans le milieu naturel d'origine (aucun transport, Raffinement). L'objectif étant de connaître les populations sauvages vivants actuellement sur ce bassin versant, le modèle animal ne peut pas être remplacé et il est indispensable d'éprélever des échantillons in situ (Remplacement).

16608 Le poumon est constitué d'alvéoles ouvertes sur le milieu extérieur pour permettre les échanges gazeux lors de la respiration. En contrepartie, il est particulièrement exposé aux polluants atmosphériques, aux poussières ou aux particules fines toxiques. Nous étudions la réponse immunitaire survenant lors d'un endommagement du tissu pulmonaire provoquée par l'inhalation de ces composés et conduisant chez l'homme à des pathologies chroniques irréversibles, comme la fibrose pulmonaire ou la broncho pneumopathie chronique obstructive (BPCO). De nombreuses maladies sont caractérisées par une fibrose tissulaire comme la silicose, la sarcoïdose, les maladies de métiers associées à l'inhalation de petites particules minérales ou organiques. Dans 50% des cas, la fibrose pulmonaire est d'origine

inconnue (fibrose pulmonaire idiopathique). Ces pathologies pulmonaires restent très mal comprises et aucun traitement curatif n'est disponible.

L'objectif de ce projet est d'étudier et de comprendre les acteurs cibles du système immunitaire au cours de la phase aiguë (procédure 1 : jour 1-3) et la phase chronique (procédure 2 : jours 7-56) de la pathologie chez la souris (parties 1) afin de proposer des approches thérapeutiques innovantes (parties 2).

Ce projet s'inscrit dans la continuité de travaux antérieurs qui ont conduit à la découverte d'acteurs importants dans le développement de la fibrose pulmonaire idiopathique. Nous avons développé chez la souris des modèles pertinents afin d'étudier les mécanismes mis en jeu dans ces pathologies. Par rapport au précédent projet 19361 « Etude de la réponse immunitaire pulmonaire inflammatoire, de la fibrose et de l'emphysème pulmonaire », ce projet élargit l'étude à de nouveaux aspects de la réponse immunitaire comme la réponse aux acides nucléiques et aux tests de candidats médicaments. Nous disposons de lignées de souris génétiquement modifiées et d'inhibiteurs d'intérêt pour ce projet, qui permettent d'étudier les variations de la réponse immunitaire et/ou de la pathologie et de valider les hypothèses scientifiques. Les animaux immunodéficients utilisés ne présentent pas de phénotypes dommageables dans les conditions d'hébergement de l'animalerie.

Nous utiliserons également une lignée présentant un phénotype dommageable. Le phénotype observable se caractérise par une courbe de prise de poids plus basse et une mortalité accrue à partir de quelques mois de vie. Cette lignée constitue un modèle pour une maladie chez l'enfant appelée SAVI (STING Associated Vasculopathy with onset in Infancy : la vasculopathie de l'enfant associée à STING) qui est notamment caractérisée par des lésions au niveau du poumon.

Afin de modéliser les pathologies pulmonaires pour mieux les comprendre, nous utilisons des inducteurs inflammatoires qui peuvent être des agresseurs chimiques (bléomycine, élastase), des particules /polluants (particules de silice, de noir de carbone ou issues des pots d'échappement) ou des activateurs du système immunitaire (LPS, polyI:C, ADN)

Au cours de l'expérimentation, en fonction des modèles, les animaux peuvent présenter une perte de poids et développer une gêne respiratoire. La bléomycine provoque une inflammation des poumons observable 24h après l'instillation qui se traduit par le développement d'une fibrose pulmonaire au bout de 2-4 semaines. L'instillation d'élastase provoque une inflammation conduisant à un emphysème au bout de 2-4 semaines. L'induction de pathologies pulmonaires peut affecter le bien-être animal et il convient de limiter au maximum la souffrance qui pourrait être occasionnée. L'exposition de l'animal à des inducteurs par voie intranasale ou intratrachéale se fait sous anesthésie (isoflurane 1-3% ou kétamine/xylazine 100mg/kg/10mg/kg) afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. Une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée, une grille de score clinique sera renseignée quotidiennement et les animaux atteignant le point limite mis à mort.

Positionnement du projet et règle des 3R

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul outil pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation à l'échelle de l'organisme. Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R:

Remplacement : le modèle animal est fondamental afin d'étudier l'inflammation et la pathologie pulmonaire au niveau de l'organisme vivant entier. Plusieurs niveaux de complexité sont nécessaires, impliquant des interactions entre différents types cellulaires et organes, qui ne peuvent être développés *in vitro* ou *in silico*. Cependant, des cultures *in vitro* sont privilégiées dès que possible.

Raffinement : Une anesthésie est réalisée lors d'administrations de composés par voie intranasale ou intratrachéale. Une surveillance quotidienne des animaux est réalisée. Elle consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement et de sa mobilité et une grille de score clinique est renseignée. Si des animaux présentent des signes de souffrance (point limite: score cumulé de 3 ou de 2 pour un critère), ils seront mis à mort.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. Nous optimisons chaque expérience en termes de prélèvements effectués et de paramètres mesurés.

L'ensemble des procédures 1 et 2 comprennent l'utilisation de 5616 souris maximum pour 5 ans.

16609 La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative progressive, secondaire à la perte de neurones produisant la dopamine, qui affecte plus de dix millions de personnes dans le monde. Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique par des symptômes aussi bien moteurs (rigidité, tremblement) que non moteurs (troubles digestives, cognitives). Ainsi, l'apparition de symptômes moteurs comme les tremblements, s'accompagne également chez 40% des patients de la MP de troubles mentaux tels que l'anxiété et la dépression. On parle alors de comorbidités neuropsychiatriques et ces dernières sont reconnues comme la principale cause d'incapacité dans la MP.

Si les symptômes moteurs de la MP sont classiquement associés à la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques, en revanche, les supports neurobiologiques de l'anxiété liée à la MP, avec ou sans dépression (appelée désormais anxiété / dépression) restent insaisissables. Des études anatomo-pathologiques et d'imagerie ont montré que certains noyaux du cerveau comme le noyau raphé dorsal (DRN), seraient impliqués dans le contrôle de l'humeur. Il pourrait alors représenter un support neurobiologique de choix de l'anxiété / dépression liée à la MP.

Aussi dans ce projet, nous nous proposons d'identifier les changements de l'activité du DRN dans des modèles animaux de comorbidités mentales de la MP. Nous tenterons d'établir les causes entre une activité DRN irrégulière et le développement de l'anxiété / dépression en tant que comorbidité de la MP. Cette approche sera réalisée en perturbant l'activité du DRN tant chez mes animaux témoins modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson.

Dans ce but, nous proposons la réalisation de 2 modèles expérimentaux de la maladie de parkinson (MP) chez le primate non humain (PNH) qui permettent une approche des symptômes moteurs, non-moteurs et cognitifs de cette maladie. Notre stratégie reposera sur deux modélisations de la MP chez le PNH avec (i) un le modèle étalon de parkinsonisme obtenu par administration intraveineuse d'une toxine (MPTP) et (ii) modèle SINEUP- α syn obtenus après administration dans le cerveau d'une construction virale.

Ces modèles permettent d'évaluer l'effet bénéfique d'approche innovante de thérapie génique sur les composantes comportementales (l'amélioration des symptômes moteurs, non-moteurs et/ou cognitifs) et cellulaires (effet neuroprotecteur sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques) de la MP chez le PNH.

Le suivi par Imagerie et les tests comportementaux utilisé en clinique permettront de valider notre approche.

Le fonctionnement des neurones se fera par la mise en place d'électrode d'enregistrements selon une procédure chirurgicale similaire à celle réalisée dans le traitement d'environ 10% patients atteints de MP

Dans le respect de la règle des 3 R :

Ce projet nous contraint à utiliser le PNH du fait de sa proximité avec l'homme en terme d'anatomie cérébrale et de répertoire comportemental. Il n'y a pas à ce jour de modèle préclinique qui s'affranchisse de l'utilisation de PNH permettant d'évaluer les symptômes de la MP tant sur le plan moteur que cognitif. Le projet dans sa globalité fait intervenir des tests in-vitro puis in-vivo chez les rongeurs (qui sont de bons modèles de la physiopathologie de la MP mais ne présentent pas de syndrome parkinsonien) pour la mise au point des construction SINEUPs. Le remplacement par des modèles précédents ne permettrait pas de répondre à nos questions.

38 macaques participeront à l'étude.

Ce nombre réparti sur les 5 années du projet, est suffisant pour obtenir une réponse statistique significative et une reproductibilité compte-tenu de la variabilité intrinsèque des paramètres comportementaux, histologiques et électrophysiologiques qui seront évalués.

Par ailleurs, les animaux seront réutilisés dans les différentes procédures. De plus l'imagerie et le système d'enregistrement permettront de suivre les animaux longitudinalement et donc d'obtenir beaucoup de données issues d'un même animal et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Pour le respect du R de raffiner, les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées via les molécules les plus adaptées. Elles sont réalisées sous anesthésie générale et le traitement analgésique initié pendant les chirurgies est poursuivi systématiquement pendant 2 jours. Il pourra être prolongé ou complété si nécessaire (évaluation quotidienne) pour s'assurer qu'aucune douleur n'est ressentie.

Tout le long du projet, plusieurs critères sont pris en compte pour suivre 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 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 étape. Pour leur bien-être, limiter leur stress et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet les animaux sont hébergés ensemble dans une structure spécialement agréée pour l'hébergement et l'utilisation des PNH en recherche, disposant d'équipements et de protocoles adaptés au raffinement du milieu pour cette espèce (nourriture variée, jouet, fond sonore...).

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.

Enfin, pour s'assurer au mieux du bien-être de ces animaux, ils sont et seront observés quotidiennement par le personnel compétent sur des critères comme la posture de l'animal, son activité, son interaction, sa nutrition etc. Une surveillance vidéo 24/24 permettra également de les observer sans les perturber.

16610 Le virus SARS-CoV-2 est responsable de la pandémie mondiale que nous connaissons actuellement avec plus de 210 pays ou territoires affectés, plus de 10 millions de personnes infectées dont plus de 500 000 morts.

Notre laboratoire va mettre au service de la recherche sur SARS-CoV-2 son expérience dans le développement de modèles précliniques de souris par modification génétique associé à une analyse à haut contenu de la fonction de leurs cellules immunitaires après infection. Ainsi, les équipes du site vont développer et valider en parallèle et en mode accéléré une ressource de nouveaux modèles murins de souris humanisées exprimant le récepteur de SARS-CoV-2 (hACE2) de manière ubiquitaire ou tissu-spécifique, permettant de mieux comprendre l'évolution de cette pathologie et les facteurs influençant sa gravité. Après avoir été analysés dans le laboratoire de biosécurité de niveau 3 (BSL3) ces modèles seront mis à la disposition de la communauté scientifique. Les modèles produits seront validés sur le plan de la physiopathologie de l'infection par SARS-CoV-2 en comparaison à la pathologie observée chez l'homme. Ils seront aussi étudiés extensivement du point de vue des réponses immunitaires innées et adaptatives suscitées par l'infection par le SARS-CoV2 pour connaître les voies conduisant à une amélioration des symptômes mais aussi celles susceptibles de contribuer à la maladie, la gravité et la mort. Les modèles de souris produits fourniront non seulement des informations clés sur les mécanismes de la pathophysiologie de la maladie COVID19 et les interactions pathogène-hôte mais pourront également servir de plateformes d'évaluation préclinique à haut débit pour identifier des antiviraux et des vaccins performants, essentiels pour les essais humains en aval.

Le virus SARS-CoV-2 pénètre dans les cellules hôtes par la liaison du récepteur cellulaire de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2). Malheureusement, les souris de laboratoire standard ne supportent pas l'infection par le SARS-CoV-2 en raison de l'incompatibilité de la protéine S (Spike) avec l'orthologue murine (mACE2) du récepteur humain, ce qui complique le développement du modèle. Pour cela nous envisageons la production et l'analyse de 15 modèles différents chez lesquels la protéine hACA2 sera exprimée dans différents types cellulaires sélectionnés pour l'expression du récepteur ACE2 chez l'homme, la protéine sera exprimée sous une forme native ou sous une forme mutée. Tous ces modèles seront testés en tout premier lieu pour l'expression du récepteur humain hACE2 dans le ou les types cellulaires ciblés et seront caractérisés de manière intensive pour les plus

prometteurs. Pour tous les modèles produits la première infection au SARS-CoV-2 sera suivie avec une attention redoublée pour évaluer la sévérité de la pathologie et adapter l'expérimentation. En effet une perte de poids rapide de poids de 20%, des signes sévères de détresse respiratoire et une léthargie prononcée seront immédiatement suivie de l'euthanasie (tableau de score) et de l'autopsie de l'animal avec prélèvement d'organes pour évaluation de la charge virale et analyses des différents organes (poumon, rate, ganglions, intestins, cerveau, foie...). Les expérimentations ultérieures et leur déroulé prendront en compte bien sûr le degré de sévérité de la réponse et le temps d'expérimentation à respecter. En choisissant le modèle approprié nous pourrions tester différentes approches vaccinales ou thérapeutiques en collaboration avec les laboratoires académiques ou industriels.

Ces travaux nécessiteront l'utilisation de lots suffisamment larges pour ne pas multiplier les expériences et avoir un effectif statistiquement relevant. Ce nombre sera précisé pour chaque type d'expérimentation. Nous avons évalué à 8256 le nombre total d'animaux à utiliser pour la réalisation de ce programme.

Ce travail sera réalisé dans le respect de la règle des 3 R.

Remplacer: 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: Le nombre d'animaux utilisés par type de procédure sera précisé et sera résumé de manière détaillée. Nous prévoyons d'utiliser des animaux des deux sexes âgés de 8 à 20 semaines. Pour chaque expérience des groupes homogènes d'animaux seront constitués pour permettre une évaluation statistique plus pertinente. Dans la mesure du possible nous essayerons de multiplexer les expériences pour n'utiliser qu'un groupe contrôle pour plusieurs essais. Cette réduction ne sera pas prise en compte dans le calcul du nombre d'animaux mais sera appliquée à chaque fois que cela sera possible.

Raffiner: Les souris sont élevées avec soin et respect, en présence d'éléments d'enrichissement. Les souris seront hébergées par groupe de 5 pour éviter le stress de l'isolement et les cages seront systématiquement enrichies par l'ajout de plusieurs éléments : un dôme en carton pour leur procurer un abri, de la nourriture hydratée dès que nécessaire pour pallier toute perte de poids et/ou déshydratation durant leur hébergement. Comme nous étudions la réponse immunitaire, aucun anti-inflammatoire ne pourra être administré aux souris. En effet, ces molécules pourraient interférer avec nos résultats et masquer l'expression des marqueurs d'intérêt. Les souris en expérimentations seront observées quotidiennement par le personnel formé et qualifié en charge de l'expérimentation. L'utilisation de la grille de score et un suivi pondéral journalier permettra de définir les actions à mettre en œuvre aux premiers signes de souffrance chez les souris.

16611 Depuis une dizaine d'année, des thérapies cellulaires innovantes utilisant des lymphocytes T (ou cellules T), un des principaux acteurs de notre système immunitaire, ont émergé en oncologie. Les avancés scientifiques nous permettent en effet de modifier génétiquement ces cellules pour qu'elles expriment un récepteur spécifique (appelé CAR pour Chimeric Antigen Receptor) afin qu'elles ciblent et attaquent les cellules cancéreuses. Ce type de thérapie cellulaire (CAR-T) s'est avéré très efficace et potentiellement curatif pour les patients atteints de certains types de cancer.

Les cellules T régulatrices (Tregs) sont un autre type de lymphocytes T qui eux, sont capables de contrôler les réponses immunitaires et de limiter le développement des maladies auto-immunes et inflammatoires. En utilisant les mêmes techniques que celles utilisées pour les cellules T anti-cancéreuses, nous pouvons également modifier le génome de ces Tregs (CAR-Tregs) et les rendre plus efficaces pour réduire les réponses immunitaires inflammatoires.

A l'heure actuelle, les cellules utilisées pour fabriquer le médicament sont prélevées chez le patient à traiter, modifiées génétiquement puis réinjectées au même patient. Cette approche présente cependant plusieurs limitations dues au temps requis pour la fabrication du produit, à la complexité du processus de production et aux coûts de production.

Les avancées technologiques et scientifiques ont ouvert une nouvelle perspective pour créer des thérapies cellulaires qui pourraient être produites à partir d'un donneur sain. En modifiant le génome des cellules du donneur sain afin qu'elles ne soient pas reconnues comme « étrangères » et rejetées par les patients qui vont les recevoir, ces cellules permettraient de traiter non pas un seul patient mais des centaines ou milliers de patients.

Nous avons développé nos techniques d'édition du génome pour créer ces CAR-Tregs afin de pouvoir offrir ce type de thérapie cellulaire au plus grand nombre de patients tout en réduisant la durée et les coûts de production. Néanmoins, il est important de vérifier que les modifications de certains gènes n'altèrent pas la biologie des cellules Tregs. A cet effet, et afin d'obtenir les données précliniques pour les premiers tests chez l'humain, nous testerons ces cellules dans un modèle de souris immuno-déficiente NSG ou des souches dérivées de la souche NSG (NSG-SGM3 et HLA-A2 NSG). Les souris NSG ont été génétiquement modifiées pour accepter une greffe de cellules souches humaines et ainsi de reconstituer un système immunitaire humain complet. Ceci permettra d'évaluer l'effet de nos modifications génétiques sur les cellules Tregs humaines et d'obtenir des données scientifiques dans un contexte le plus proche possible de la situation clinique.

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 de l'acceptation ou du rejet des CAR Tregs modifiés. Cependant, de nombreux tests *in vitro* permettant une première sélection importante de nos cellules seront effectués afin de valider leur qualité avant les tests *in vivo* (Raffinement) : 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 utilisé, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement pertinents. Le projet se déroule en 3 étapes qui ne seront réalisées que si l'étape précédente a donné des résultats scientifiques concluants. De même, bien que nous prévoyions 3 expériences, si les 2 premières expériences donnent le même résultat, la 3ème sera annulée pour réduire le nombre de souris utilisées. Un nombre total de 1224 souris sera nécessaire.

16612 Diabète est une maladie métabolique caractérisée par l'hyperglycémie et affecte plus de 400 millions de la population à travers le monde. Il reste un des problèmes majeurs de la santé publique. Cette pathologie est essentiellement due, au mauvais fonctionnement de la production d'insuline par des cellules bêta de pancréas. Les cellules pancréatiques sont réduites de 40 à 60% dans le cas de diabète de types 2 et de 70 à 90% dans le cas de diabète de type 1.

Des progrès significatifs ont été réalisés, pour la prise en charge des patients diabétiques, pour pouvoir réguler l'apport d'insuline. Ce pendant d'autres stratégies thérapeutiques sont en cours d'étude afin de trouver d'autres alternatives thérapeutiques pour préserver les cellules pancréatiques contre la destruction.

L'objectif de notre projet est d'évaluer l'activité des molécules pharmacologiques (des nouvelles cibles thérapeutiques) chez la souris dans un modèle de diabète de type 1. Nous espérons ainsi valider l'efficacité de ces nouveaux produits dans cette pathologie à fort nécessité thérapeutique. Avant d'envisager de commencer des essais cliniques chez l'homme.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : Nous ne pouvons pour l'instant pas remplacer cette étape, étant donné qu'il est impossible de restituer actuellement la complexité du vivant dans les modèles *in vitro*. De plus, étant donné que ces produits sont destinés à des fins thérapeutiques, pour des futurs essais cliniques, aucun, agence réglementaire, ne permet de commencer une étude clinique chez l'homme, avant de montrer l'efficacité des composés dans un modèle adapté chez l'animal.

Raffiner : Avant de démarrer le protocole nous faisons une série de vérifications pour s'assurer que le produit administré présente le profil autorisé (choix de solvant, pH) pour être administré à l'animal. De plus, seuls les composés, biodisponibles, vont faire l'objet d'une étude d'efficacité.

Nous faisons également une étude préalable, pour déterminer les doses administrées ne présentant aucun effet indésirable pour l'animale pendant l'étude. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier d'état général des animaux. Et une mesure du poids de l'animal une fois par semaine.

Réduire : En accord avec les publications scientifiques et selon des contraintes statistiques nous réalisons notre étude en respectant le principe de 3R. Le nombre d'animaux utilisé, a été conçu de manière, à obtenir des résultats fiables, sans l'utilisation de manière inutile.

Il est prévu d'évaluer l'activité de 5 candidats médicaments par an (330 souris par an) sur une période de 5 ans soit un total de 1650 souris.

16613 Une cellule vieillissante ou soumise à certains stress peut s'engager sur la voie de la sénescence. Il s'agit d'une voie conduisant au « gel » de la cellule, lui permettant de rester active mais avec des fonctions très limitées. Ces cellules sont généralement considérées comme nuisibles pour l'organisme et sont habituellement éliminées par le système immunitaire. Néanmoins, en vieillissant, ce dernier devient moins efficace et ces cellules s'accumulent.

L'impact des cellules sénescents (CS) sur le corps reste incompris mais réduirait l'espérance de vie en favorisant l'apparition de différentes pathologies liées à l'âge comme l'athérosclérose, la prise de poids ou le diabète. Par conséquent, il est supposé que la délétion des CS devrait augmenter l'espérance de vie en diminuant les comorbidités associées à l'âge.

L'objectif de ce projet est de caractériser la sénescence durant le vieillissement sur des souris dont on réduira les CS par traitement avec une catégorie particulière d'agents thérapeutiques nommés sénolytiques.

Nous nous intéresserons à l'organisme entier avant d'étudier plus spécifiquement certains tissus en nous basant sur des résultats préliminaires. Ce projet de recherche fondamental permettra d'aider à la compréhension et à la prise en charge de pathologies liées au vieillissement au sens large.

Pour étudier les CS nous utiliserons un modèle transgénique murin non dommageable qui ciblera spécifiquement les cellules sénescents en se basant sur l'expression de la protéine p16, un marqueur bien connu de la senescence. Dans ce modèle nommé « p16 /GFP », l'expression d'une protéine fluorescente appelée « GFP » sera corrélée avec l'expression de p16 et permettra ainsi de marquer les CS. Cette souche de souris sera utilisée en association éventuelle avec les sénolytiques.

Ces sénolytiques sont un type très hétérogène de molécules qui semblerait provoquer la mort des cellules sénescents. Pour ce projet nous avons choisi une combinaison de 2 molécules bien connues et déjà utilisées ensemble sur des modèles murins pour déleter les CS : le Dasatinib et le Quercetin (D/Q). Les études utilisant ces produits n'ont pas rapporté d'effets indésirables aux concentrations efficaces pour tuer les CS.

L'association « modèle p16/GFP+D/Q » permettra de confirmer que les cellules ciblées par les sénolytiques sont bien des CS, mais aussi d'identifier les tissus qui sont le plus sensible au traitement, c'est-à-dire ceux qui perdent le plus de cellules GFP. Afin d'analyser comment l'organisme parvient à compenser cette perte de cellules sénescents, un certain nombre de souris traitées et contrôles seront injectées avec un produit nommé EDU : celui-ci permet en effet de marquer les cellules qui prolifèrent, par exemple pour remplacer des CS tuées par le traitement.

Les animaux seront gardés en vieillissement en animalerie, et euthanasiés aux âges de 12 mois, 18 mois et 24 mois. Ils seront traités aux sénolytiques D+Q par gavage une fois par semaine pendant les 3 mois précédant leurs sacrifices. Un petit prélèvement de sang sera effectué toutes les 2 semaines au niveau de la veine caudale afin d'observer les effets des sénolytiques et de contrôler la santé des animaux.

Les animaux bénéficieront d'une attention particulière au niveau de la surveillance compte tenu de la composante de vieillissement. Une fiche de score sera ouverte et permettra de suivre l'animal, de prévoir d'éventuels soins adaptés, ou d'envisager l'euthanasie si un point limite est atteint.

Prise en compte des 3R :

- Raffinement : l'état de santé des animaux sera apprécié au moins 1 fois par semaine lors d'un examen approfondi avec recherche de symptômes cliniques. Une feuille de score a été construite afin de recenser les symptômes/dommages pouvant apparaître sur l'animal et de déterminer si l'état de santé de l'animal permet de continuer l'expérience ou si elle doit être arrêtée (point limite).

- Remplacement : la sénescence étant un processus intégré impliquant une communication intra- et inter- cellulaire et tissulaire, ce projet nécessite une étude à l'échelle de l'organisme entier et aucune solution de remplacement n'a pu être envisagée.

- Réduction : des efforts seront faits pour limiter le nombre de souris nécessaires par groupe, par exemple en utilisant les règles statistiques adéquates (logiciel gpower). En se basant sur la littérature déjà existante et en prenant en compte les exigences de réduction, nous constituerons des groupes expérimentaux composés au maximum de 20 animaux. Les génotypes des souris générant nos souris expérimentales sont également pensés pour limiter au maximum la naissance de souris inutile au projet.

Pour cette étude de vieillissement, nous aurons besoin de 120 souris sur 3 ans.

16614 Lorsqu'une cellule vieillit, ou est soumise à certains stress, elle peut s'engager sur la voie de la sénescence. Il s'agit d'une voie qui conduit au « gel » de la cellule, lui permettant de rester active mais avec des fonctions très limitées.

La cellule sénescence, qui se caractérise notamment par l'expression de la protéine p16, continue cependant à influencer son environnement en sécrétant certains facteurs. Elle peut donc altérer certains mécanismes biologiques normaux ou pathologiques. La sénescence semble ainsi jouer un rôle important dès l'embryogenèse, et pourrait également favoriser de nombreuses pathologies liées à l'âge comme l'athérosclérose, la prise de poids ou le diabète.

Malgré tout, son rôle et celui de la protéine p16 restent très mal connus.

L'objectif de ce projet est de caractériser la sénescence dans des conditions normales (sans pathologie induite) en identifiant ses effets et l'implication de la protéine p16.

Nous nous intéresserons à l'organisme entier avant d'étudier plus spécifiquement certains tissus en nous basant sur des résultats préliminaires.

Ce projet de recherche fondamentale permettra d'aider à la compréhension et prise en charge de pathologies liées au vieillissement au sens large.

Il repose sur le recours à deux modèles murins. Ceux-ci permettront de cibler spécifiquement les cellules exprimant la protéine p16 (notés p16+). Dans le premier modèle, nommé « p16 /GFP », l'expression d'une protéine fluorescente nommée GFP permettra de localiser les p16+. Cette expression sera corrélée avec la production de la protéine p16. Le second modèle « p16 /DTA » est un modèle d'ablation cellulaire. Il permettra de tuer les cellules sénescence en corrélant la production de la protéine p16 avec celle d'une protéine tueuse nommée DTA. Ce modèle permettra de déterminer la fonction et l'importance des cellules sénescence en observant les conséquences de la déplétion des cellules sénescence sur le fonctionnement des tissus.

Ces deux modèles (Modèle 1 « localisation », Modèle 2 « ablation ») seront utilisés en parallèle, les p16CreER/GFP servant de contrôle aux p16CreER/DTA. On notera que l'expression de la GFP et de la DTA ne sera activée qu'après exposition au tamoxifène.

Les souris seront incluses dans l'expérience à l'âge de 4 mois (groupe « jeune ») et 14 mois (groupe vieux) et seront sacrifiées un mois après le début de l'exposition au tamoxifène : la comparaison des 2 groupes sera intéressante pour évaluer l'importance des p16+, en termes de nombre et de fonction, durant le vieillissement.

Les p16CreER/GFP et p16CreER/DTA étant de type inductible, ce ne sont pas des phénotypes dommageables. De plus, même après traitement au tamoxifène, les souris p16CreER/GFP ne développeront aucune pathologie. En ce qui concerne les p16CreER/DTA, bien que nous n'attendions pas de pathologie par suite de la délétion en p16+, le manque de recul sur cette lignée nous pousse à la considérer comme susceptible d'en développer après l'exposition au tamoxifène seulement.

Le tamoxifène est fréquemment utilisé pour activer des transgènes de modèles murins sans avoir de conséquence sur la santé et la souffrance des souris aux concentrations et aux temps d'expositions que nous utiliserons.

Une fiche de score avec pesée hebdomadaire sera ouverte dès le début du protocole et permettra de suivre l'animal, de prévoir d'éventuels soins adaptés, ou d'envisager l'euthanasie si un point limite est atteint. Certains points de cette feuille sont réservés à l'évaluation des p16CreER/DTA, ceux-ci étant plus susceptibles de développer une pathologie.

Prise en compte des 3R :

- Raffinement : l'état de santé des animaux sera apprécié au moins 1 fois par semaine lors d'un examen approfondi avec recherche de symptôme clinique. Une feuille de score, dont une partie est spécifique de p16CreER/DTA, a été construite afin de recenser les symptômes/dommages pouvant apparaître et de déterminer si l'état de santé de l'animal permet de continuer l'expérience ou doit être arrêtée (point limite). Les souris seront pesées une fois par semaine et euthanasiées en cas de perte de poids supérieure à 15% par rapport à la précédente pesée.

- Remplacement : La sénescence étant un processus intégré impliquant une communication intra- et inter- cellulaire et tissulaire, ce projet nécessite une étude à l'échelle de l'organisme entier et aucune solution de remplacement n'a pu être envisagée.

- Réduction : des efforts seront faits pour limiter le nombre de souris nécessaires par groupe, par exemple en utilisant les règles statistiques adéquates (logiciel gpower).

En se basant sur la littérature déjà existante et en prenant en compte les exigences de réduction, nous constituerons des groupes expérimentaux composés au maximum de 25 animaux par génotype et par temps, soit :

25 animaux X 2 temps X 2 génotypes : 100 souris.

16615 Les gènes à microARNs régulent l'expression d'autres gènes. Ces gènes ont été impliqués dans de nombreuses pathologies humaines, en particulier les cancers et certaines maladies mentales (schizophrénie) et neurodégénérative (Alzheimer, démence fronto-temporale). Le projet vise à étudier si et comment ces gènes contrôlent la formation des nouveaux neurones (la neurogenèse). La compréhension du rôle de ces gènes permettra d'expliquer comment la perturbation de leur expression entraîne un comportement pathologique des cellules.

Le modèle biologique utilisé dans ce projet sera la neurogenèse post-natale du bulbe olfactif de souris. Cette neurogenèse ne peut être étudiée qu'*in vivo* car elle dépend fortement de l'environnement cellulaire dans lequel elle se déroule et de l'environnement olfactif dans lequel évolue l'animal.

Ce projet a 2 objectifs principaux :

1/ Déterminer les étapes de la neurogenèse qui dépendent des gènes à microARNs. Pour cela nous utiliserons une lignée de souris mutante rendue incapable de synthétiser des microARNs. Grâce à cette lignée de souris nous pourrions étudier les conséquences de l'absence de microARNs sur la production de nouveaux neurones.

2/ Développer une nouvelle technique de biologie moléculaire, appelée Ago-APP, permettant d'identifier les gènes à microARNs actifs au cours de la neurogenèse. Parmi ceux-ci, nous en choisirons 5 pour lesquels nous identifierons la fonction exacte.

Dans la réalisation de ce projet nous prévoyons de limiter le nombre d'animaux utilisés à 580 et aurons à cœur d'appliquer constamment la règle des 3 R.

Remplacement : Nous réalisons les phases initiales de mise au point de la technique Ago-APP chez la drosophile. Ago-APP ne sera appliquée sur la souris que lorsque le protocole final aura été établi.

Réduction : Dans le plan d'expérience visant à étudier l'influence de l'arrêt de la synthèse des microARNs sur la neurogenèse, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés nous ferons en sorte que les groupes tests et témoins soient contenus dans la même portée.

- Pour les études de génétique qui nécessitent une modification du patrimoine génétique, plutôt que de créer de nouvelles lignées de souris transgéniques qui nécessitent l'utilisation de nombreux animaux

pour leur création et leur entretien nous privilégierons la technique d'électroporation *in vivo*. Cette technique permet de modifier le patrimoine génétique d'une toute petite population de cellules dans une souris sauvage. De plus, nous la maîtrisons parfaitement ce qui assure un taux de succès maximal de nos expériences et évite de les répéter inutilement en cas d'échec. Cette expérience acquise ainsi que la maîtrise des tests statistiques sur petits échantillons auxquels nous ont été formés, permettra de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés

- Dans ce projet nous comparerons l'activité des gènes à microARNs en présence ou en absence d'odeur. Pour cela nous boucherons une narine d'un animal et étudierons l'activité des gènes à microARNs dans le bulbe olfactif correspondant à la narine bouchée en comparaison avec l'autre bulbe, celui correspondant à la narine non bouchée. Ainsi, les conditions « présence » et « absence » d'odeurs seront réalisées dans le même animal ce qui limitera le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Les conditions sanitaires et environnementales des élevages sont contrôlées quotidiennement pour être maintenues dans un état optimal. Le personnel est instruit pour intervenir très rapidement en cas de problème. Les animaux sont élevés en groupe dans des cages enrichies avec des carrés de coton et des bâtons de bois. Au cours de l'expérimentation les animaux sont hébergés au calme dans une salle post-opératoire et les procédures sont adaptées pour réduire la souffrance au maximum (utilisation de lidocaïne pour les injections, utilisation de doses sub-létales d'anesthésique pour les perfusions intra-cardiaques). Les signes de souffrance et d'anxiété sont systématiquement recherchés et quantifiés via une échelle de scores afin d'agir en conséquence lorsque les points limites prédéfinis sont atteints. Chaque observation faite et les actions entreprises sont notées dans le registre du bien-être des animaux.

16616 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 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 peut être associée à des changements microbiotiques 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'une « obésité » pouvait être obtenue 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 limiter la prise de poids lorsque les animaux sont placés sous un régime hyper-lipidique.

Nous utiliserons au total un maximum de 48 souris C57BL/6J 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, étant donné que la régulation de l'appétit ou du métabolisme, implique une communication bidirectionnelle entre le cerveau et le reste de l'organisme, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode *in vitro* ou *in silico* qui puisse remplacer ce type d'étude. 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 réalisés pour évaluer le plus petit nombre d'animaux nécessaire par groupe et permettant d'obtenir des 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, afin de raffiner les procédures et de réduire tout stress, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal en garantissant un enrichissement de l'environnement et une habituation aux expérimentateurs. Par ailleurs, nous avons privilégié une méthode d'études de la composition corporelle (masse grasse, masse maigre) par résonance magnétique nucléaire non traumatisante et qui nous permet de suivre l'évolution au cours du temps chez un même animal et un système de cages métaboliques où l'espace offert aux animaux est important.

16617 Le sepsis est un dysfonctionnement d'organes secondaire à une réponse inappropriée de l'hôte suite à une infection systémique sévère notamment des infections de l'appareil digestif qui représente un problème majeur de santé publique. En 2017, 49 millions de cas de sepsis ont été recensés dans le monde ce qui représente environ 20% de la mortalité globale. Malgré les recherches et les travaux publiés ces dernières années, les mécanismes physiopathologiques qui conduisent à l'aggravation du sepsis et à son issue défavorable sont encore mal connus.

La maladie parodontale est une pathologie infectieuse chronique qui affecte plus de 80 % de la population âgée de plus de 65 ans. Elle se caractérise par une inflammation et une perte de l'attachement de la gencive autour de la dent ce qui aboutit à la formation d'une poche dans laquelle se niche les pathogènes parodontaux. A ce jour, à notre connaissance, aucune étude n'a pu mettre en évidence le rôle de la parodontite dans l'évolution du sepsis. Cependant, de nombreux travaux ont montré que les bactéries parodontales et en particulier *Porphyromonas gingivalis* peuvent aggraver de nombreuses autres pathologies comme par exemple les maladies cardiovasculaires et la maladie d'Alzheimer. De plus, quelques travaux ont montré que les bactéries parodontales peuvent passer dans la salive et être retrouvées au niveau de l'intestin et dans les fèces.

Notre hypothèse est donc qu'en cas d'infection abdominale comme la péritonite, *Porphyromonas gingivalis* va être disséminée dans le corps et amplifier la réponse inflammatoire et la défaillance multi-organes liées au sepsis.

La mise en place de ce projet chez la souris pourrait nous permettre de montrer si la maladie parodontale peut expliquer pourquoi certains patients septiques ont une issue clinique défavorable alors que d'autres au contraire ont une issue plus favorable. Pour valider notre hypothèse, nous devons utiliser un modèle expérimental chez l'animal car c'est le seul moyen à l'heure actuelle pour étudier les différents aspects de notre projet.

Pour notre étude, qui va se dérouler sur 12 mois, nous utiliserons un modèle de péritonite chez la souris. Pour cela, nous injecterons chez des souris, par voie intra-péritonéale une solution de fèces supplémentée ou non avec *Porphyromonas gingivalis*.

Les animaux seront maintenus en vie jusqu'à 3 jours après l'infection. Un prélèvement sanguin aura lieu une fois par jour le temps de l'expérience et les animaux seront euthanasiés pour prélever le sang, l'urine, le cerveau, le foie et les reins.

Afin de vérifier notre hypothèse, le recours à l'animal est nécessaire car le sepsis secondaire à une infection polymicrobienne est une pathologie multi-organes liée au passage des bactéries de l'intestin dans la circulation sanguine et qui ne peut être reproduite *in vitro*. Afin de minimiser l'utilisation du nombre d'animaux, une étude statistique a été effectuée pour calculer le nombre d'animaux minimum nécessaire mais suffisant pour valider notre étude. Le nombre d'animaux nécessaire est donc de 86 souris.

Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de vérifier le bien-être des animaux et la présence de signes de souffrances grâce à la mise en place d'une grille de scoring. La prise en charge de la douleur se fera dès le début de l'expérience et durant toute sa période par l'administration d'analgésiques. Si la douleur venait à persister et/ou s'amplifier ainsi que l'apparition de point limites entrainerait l'euthanasie des animaux.

16618 Comprendre les mécanismes qui déterminent le destin et la spécialisation des cellules au cours du développement est une question fondamentale, qui a des répercussions immédiates sur notre compréhension de l'origine des maladies congénitales et des cancers. Dans ce contexte, nous nous

intéressons au rôle de la méthylation de l'ADN, une modification biochimique naturelle de l'ADN. En influençant l'expression des gènes sans en modifier leur séquence, la méthylation de l'ADN est intimement liée à l'établissement et la consolidation de l'identité des cellules, selon un mode de régulation dit « épigénétique ».

Les profils de méthylation de l'ADN sont très dynamiques au cours du développement embryonnaire précoce, alors que les cellules embryonnaires subissent des changements drastiques d'identité. Juste après la fécondation, l'embryon nouvellement formé perd d'abord massivement les profils de méthylation de l'ADN dont il a hérité du spermatozoïde et de l'ovule. Cette phase s'accompagne d'une relaxation de l'identité, comme la fonction « reboot » d'un ordinateur, qui donne un statut de pluripotente à l'embryon, c'est-à-dire la capacité de former tous les tissus spécialisés dont un individu a besoin pour vivre et se reproduire. Au moment de son implantation dans l'utérus (au bout de 4 jours chez la souris et environ 1 semaine chez l'Homme), l'ADN de l'embryon se reméthyle. Ceci coïncide avec le passage de l'embryon d'un état de pluripotente « naïve » à « engagée », comme si la méthylation agissait comme un verrou de non-retour. Cette étape est ensuite suivie de la diversification des cellules de l'embryon vers différentes spécialisations (muscle, foie, neurone etc...). Certaines cellules se démarquent rapidement d'une fonction somatique (les tissus qui nous permettent de vivre) et s'engagent vers une voie dite germinale (les tissus qui nous permettent de nous reproduire). Ces cellules germinales, qui formeront à terme les spermatozoïdes ou ovules, subissent un nouvel effacement de leurs profils de méthylation. Elles ne regagneront de la méthylation de l'ADN que lors de la maturation finale en spermatozoïdes ou ovules, suivant le sexe de l'individu. Notre but est de comprendre le rôle de la méthylation de l'ADN dans ces prises d'identité cellulaire primordiales que subit l'embryon précoce.

En utilisant un modèle de culture de cellules embryonnaires souches (ES, qui dérivent de la culture d'un embryon en phase de pluripotente, c'est à dire apte à former tous les tissus, somatiques ou germinaux), nous avons montré que l'incapacité de méthyle le génome n'altère pas la transition d'un état de pluripotente naïve à engagée. Nous voulons maintenant prouver que la spécialisation en cellules somatiques est cependant impossible, et que ces cellules embryonnaires sans méthylation prennent par défaut une voie germinale. Pour cela, nous avons besoin d'une approche *in vivo*.

Notre projet a été élaboré en conformité avec le principe des 3R : Réduction, en pratiquant plusieurs analyses sur le même animal ; Remplacement, par l'utilisation de systèmes cellulaires ; et Raffinement, par une manipulation minimale des animaux vivants et l'application de procédures d'euthanasie en cas de signes de souffrance et de détresse de l'animal. 76 animaux seront utilisés pour ce projet:

16619 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 la restriction calorique améliore la mémoire chez les souris âgées. Les effets bénéfiques de la restriction calorique pour prévenir le déclin du mémoire lié à l'âge soulèvent une question cruciale : quels sont les mécanismes intracellulaires 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. Malheureusement la restriction calorique demande un effort important à une personne âgée, donc nous proposons en parallèle de tester des mimétiques de restriction calorique (poudres, cachets qui n'ont pas d'effet secondaire connu et qui potentiellement miment les effets de la restriction calorique).

Nous émettons l'hypothèse que l'autophagie du cerveau joue un rôle vital, encore inexploré, dans la convergence des restrictions caloriques sur les neurones hippocampiques pour favoriser la cognition. L'expérimentation *in vitro* ne permet pas de répondre à toutes les questions. En effet nous utilisons en grande partie les cultures cellulaires, mais elles n'apportent pas de réponses suffisantes, c'est pourquoi les modèles animaux sont nécessaires pour évaluer *in vivo* l'effet des gènes de l'autophagie sur un comportement défini et pour déterminer l'influence de l'environnement sur ces gènes.

Seule l'expérimentation animale permet d'étudier ce phénomène en conditions physiologiques et physiopathologiques et d'observer les effets de l'invalidation 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 4920 sur 5 ans. Les souris seront placées sous différents régimes (pour la restriction calorique) ou recevront par voie systémique ou orale des mimétiques de restriction calorique. Certaines souris, après la restriction calorique auront un produit inhibiteur des gènes de l'autophagie injectés dans l'hippocampe. Les souris seront soumises à différents tests comportementaux dépendant de la mémoire hippocampique : test de la reconnaissance d'un nouvel objet, test de mémoire spatiale ...

Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées sera réduit à son minimum : analyses de paramètres 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.

16620 La cornée est un tissu transparent à l'avant de l'oeil. Dans certaines pathologies des vaisseaux sanguins envahissent de façon anormale l'intérieur de la cornée claire. Ce phénomène appelé « néovascularisation cornéenne », est un problème majeur de santé publique, la perte de la transparence de la cornée empêche une vision correcte et peut conduire à la cécité. Les origines sont multiples : maladies héréditaires, séquelles de traumatismes ou de brûlures, complications d'infections virales ou bactériennes, suites des greffes de cornées, port prolongé de lentilles de contact. Les traitements ciblent la régression des vaisseaux par application de produits anti-inflammatoires, coagulation des vaisseaux par laser ophtalmique, ou transplantation de membrane amniotique. Les traitements ne sont pas toujours efficaces et les effets secondaires ne sont pas à négliger : augmentation de la pression intra oculaire, apparitions de cataracte (opacification du cristallin, autre structure de l'oeil dont la transparence est capitale pour la vision). Les récents traitements visent les facteurs directement impliqués dans la formation des nouveaux vaisseaux au niveau moléculaire. L'objectif du projet est la mise en place au sein de l'établissement utilisateur d'un modèle expérimental de néovascularisation cornéenne chez le lapin et les rongeurs afin de participer au développement de nouvelles thérapies pour cette pathologie. Le principe est d'induire sur un seul oeil, la prolifération de vaisseaux suite à une lésion. En raison des particularités physiologiques et anatomiques de l'oeil et l'absence pour l'instant de modèle alternatif pour ce type de projet, nous aurons recours à des animaux adultes, des lapins et des rongeurs. Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience nous permettront de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Pour ce projet, d'une durée de 5 ans, un nombre maximum de 2250 lapins de 8 à 12 semaines, 2250 rats et 2250 souris de 6 à 12 semaines soit de jeunes adultes, est envisagé afin de tester l'efficacité des traitements.

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'oeil 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'oeil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'oeil 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.

16621 La névrite optique (NO) se caractérise par des épisodes subaigus et auto-limités d'inflammation du nerf optique avec une diminution unilatérale de l'acuité visuelle d'intensité variable. Ce symptôme qui évolue, en quelques jours voire en plusieurs semaines, est fréquemment observé dans les maladies inflammatoires et démyélinisantes du système nerveux central telles que la sclérose en plaques (SEP) et la neuromyéélite optique (NMO) qui sont toutes deux des maladies auto-immunes. En effet, plus de 50% des patients SEP ont une expérience NO. Elle représente la première manifestation de la maladie chez 20% des patients SEP. Globalement réversibles et unilatéraux au départ, les déficits visuels peuvent devenir bilatéraux et finalement permanents, entraînant une invalidité sévère. Des symptômes visuels permanents peuvent ainsi persister dans 40 à 60% des cas, et des épisodes répétés de NO peuvent entraîner une atrophie importante du nerf optique et donc à terme une invalidité permanente. Dans l'ensemble, les lésions oculaires sont très fréquentes à un moment ou à un autre au cours de la vie des patients atteints de SEP et ce quelle que soit la forme de la pathologie qu'ils expriment (la forme progressive qui consiste en une aggravation constante ou la forme rémittente caractérisée par la succession de poussées et de rémissions, de durée et fréquences variables, associées à des symptômes et statuts neuro-inflammatoires différents). Il est donc important de comprendre les mécanismes impliqués dans la NO et la déficience visuelle dans la SEP, afin de proposer des approches thérapeutiques innovantes et dédiées.

L'objectif principal de ce projet est de caractériser dans un premier temps les atteintes visuelles au cours de l'évolution de la pathologie et ce dès la phase pré-symptomatique que ce soit dans la forme progressive ou la forme rémittente. Cette caractérisation nous aidera à déterminer les mécanismes responsables de ces manifestations visuelles et de tester une thérapie innovante basée sur les travaux récents de l'unité de recherche afin de prévenir ces déficits et améliorer la qualité de vie de ces 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 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous :

La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de la SEP. 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. 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'EAE 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 l'expertise de l'équipe de recherche sur ce modèle et les données de la littérature.

En prenant en compte ces recommandations, un total de 1280 souris sera utilisé lors de ce projet.

16622 Le lupus érythémateux systémique (LES) est une pathologie auto-immune rare et complexe dont les causes précises restent mal connues. Sa survenue est multifactorielle impliquant un terrain génétique favorable et l'exposition à des facteurs environnementaux. Cette maladie fait intervenir les systèmes immunitaires inné et adaptatif aboutissant à la production d'auto-anticorps (auto-Ac) délétères pour l'organisme et responsables de lésions tissulaires. Le diagnostic repose sur la concordance de signes cliniques et biologiques évocateurs dont les plus caractéristiques sont les anticorps antinucléaires (AAN) et une signature d'interferon (INF). L'évolution de la maladie est imprévisible marquée par l'alternance de phases de poussées et de phase de rémission.

Certaines formes restent bénignes (atteinte cutanée) alors que d'autres se compliquent d'atteintes viscérales d'ordres rhumatologique, rénal, cardiaque, neurologique ou vasculaire. Le traitement conventionnel repose sur le respect de règles de vie afin de limiter les facteurs déclenchant les poussées et sur des traitements médicamenteux associant le plus souvent une corticothérapie orale à des immunosuppresseurs avec effets indésirables mais n'aboutissent pas à une guérison. Le LES demeure de ce fait, une des maladies auto-immunes systémiques les plus complexes compliquant l'approche thérapeutique.

Par ailleurs, des données expérimentales de plus en plus nombreuses chez l'animal et chez l'homme suggèrent qu'un déséquilibre du microbiote intestinal pourrait participer à la physiopathologie du LES.

Devant le manque de disponibilité de traitement approprié pour le LES, notre projet vise à :

-Etudier le microbiote intestinal en tant que sources de biomarqueurs pronostique et/ou diagnostique dans la perspective de proposer des interventions thérapeutiques reposant sur le maintien de l'équilibre de la flore intestinal.

-Tester l'efficacité d'une nouvelle molécule thérapeutique initialement développée en oncologie et dérivée de quinoléine, en comparaison à l'hydroxy-chloroquine (HCQ) qui est considéré comme le traitement de fond du LES.

Ces objectifs seront atteints par la mise en place d'un modèle de Lupus par induction.

Conformité avec les exigences de la règle des 3R

Remplacement : Il est nécessaire de tester nos observations chez un modèle de souris lupique afin de se rapprocher des conditions physiologiques réelles et potentiellement pouvoir effectuer un essai clinique chez l'homme.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit grâce à la mutualisation des techniques et analyses sur un même animal (analyse du microbiote, profil immunologique et culture cellulaire). De plus, de par notre expérience, nous avons pu déterminer le nombre de souris nécessaires à notre étude en tenant compte des éventuelles pertes que nous pourrions rencontrer.

Raffinement : La mise au point de procédures rigoureuses, la formation du personnel ainsi que le suivi quotidien de l'état de santé des animaux permettront le raffinement de ce projet. Ainsi, tout au long de l'étude, les animaux seront surveillés quotidiennement, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en envisageant l'utilisation d'antalgiques. Dès lors qu'un animal aura atteint un point limite, la souris sera euthanasiée dans le but de réduire toute douleur, souffrance et angoisse. Durant les expérimentations, les animaux seront surveillés quotidiennement, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en envisageant l'utilisation d'antalgiques. Les animaux seront hébergés en groupe de cinq maximum, dans des cages équipées afin d'offrir un environnement enrichi et approprié.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : 60 souris Balb/c.

16623 Au cours de l'évolution, les cellules ont acquis des mécanismes de résistance lors de l'exposition à des stress environnementaux.

Le principe consiste pour la cellule à se mettre dans un état qui serait comparable à un état « d'hibernation », afin de lui permettre de réduire son activité au minimum, et ainsi de focaliser son énergie sur des mécanismes de survie cellulaire.

Cette situation n'est pas viable pour la cellule sur une période qui serait trop longue ou en cas de stress trop aigu.

Dans le contexte des pathologies cancéreuses, notre hypothèse est que les cellules tumorales pourraient utiliser ce mécanisme pour survivre aux situations stressantes auxquelles elles sont soumises, telles qu'une forte hypoxie (prolifération/croissance tumorale), un ciblage par des drogues (résistance aux thérapies), la perte de contact avec leur environnement (dissémination métastatique)

...

Ainsi, les cellules cancéreuses responsables des échecs thérapeutiques et de l'évolution métastatique de la maladie, seraient par définition celles qui ont su résister à l'ensemble des stress cités ci-dessus, et dépendraient donc de la mise en route de ce mécanisme de survie.

Certaines protéines impliquées dans la régulation de cette « hibernation » cellulaire ont déjà été identifiées dans un contexte non tumoral.

Nous nous intéressons plus particulièrement à l'étude de ces mécanismes dans le cancer du sein.

Pour mener à bien ce projet, nous souhaitons développer des approches combinatoires *in vitro* et *in vivo*, afin de préciser l'implication de ce mécanisme de résistance aux stress dans le processus oncogénique mammaire (cinétique de croissance tumorale et survenue métastatique),

Nous avons généré des outils qui nous ont permis d'obtenir des données préliminaires *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancer du sein afin de valider notre hypothèse.

En complément de ces modèles de culture cellulaire en deux dimensions, nous développons actuellement des approches de culture tridimensionnelle (organoïdes) pour répondre à nos objectifs de recherche. En complément à ces méthodes d'étude, le recours aux modèles *in vivo* s'avère aussi nécessaire dans notre projet.

La croissance tumorale et la dissémination métastatique sont des processus très complexes et dynamiques. En effet, dans le processus métastatique, les données *in vitro* 2D/3D (obtenues pour la compréhension des mécanismes de survie aux stress) restent cependant d'une pertinence relative, et ne nous permettent pas de mimer au plus proche le processus physiopathologique d'échappement et de dissémination des cellules tumorales. Pour cela, nous réaliserons des approches de xénogreffes chez le modèle murin immunodéficient à partir des lignées cellulaires de cancer du sein que nous avons développé et qui sont validées *in vitro* dans le cadre de ce projet de recherche.

De plus, un composé chimique ciblant les voies de régulation de cette « hibernation » vient d'être identifié.

Si les résultats des premières expériences s'avèrent corrélés avec nos hypothèses, l'évaluation de l'efficacité *in vivo* de la molécule inhibitrice de la machinerie d'hibernation, sur les propriétés de résistance et de dissémination des cellules tumorales, sera essentielle pour sa validation préclinique.

Ce composé constituera une alternative ou un adjuvant de choix dans les traitements pour les patientes atteintes de cancer du sein afin de diminuer le développement de métastases et augmenter le taux de survie.

Nous utiliserons la méthode des 3 R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux.

Nos études seront réalisées de manière séquentielle pour caractériser d'une part l'implication des mécanismes de résistances aux stress dans le développement tumoral mammaire, et d'autre part dans le processus d'échappement métastatique.

Ensuite nous étudierons l'efficacité de la drogue sur ses phases de prolifération et de dissémination des cellules malignes. Une étude pilote sera menée sur un petit nombre d'animaux (maximum 9) afin de s'assurer de la bonne tolérance à cette molécule et d'adapter au mieux les doses à administrer aux souris de nos cohortes d'étude.

Dans un souci de remplacement, chaque fois que cela sera possible, nous utiliserons des approches substitutives *in vitro* (culture de lignées cellulaires et recours aux organoïdes).

Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, le suivi du développement de la pathologie maligne chez les animaux transplantés se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés non invasifs, tels que la mesure des greffons à l'aide d'un pied à coulisse et le recours à l'imagerie optique *in vivo* par bioluminescence.

Dans un souci de raffinement, les procédures expérimentales de transplantation seront réalisées sous anesthésie, et la mise en place d'une médication analgésique pré, per et post opératoire sera assurée pour une bonne prise en charge de la douleur chez les animaux.

Afin d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton) et par leur maintien en groupes de 3 à 5 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Pour ce projet, dont la présente demande porte sur 2 ans, nous avons estimé le nombre d'animaux à 107 souris.

16624 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une pathologie très fréquente et invalidante qui représente un enjeu de santé publique. Cette pathologie auto-immune induit une inflammation chronique des articulations conduisant à la destruction des os et du cartilage, pouvant aboutir à des déformations irréversibles des articulations. Cette maladie peut s'accompagner d'une pneumopathie interstitielle diffuse fibrosante qui est associée à un très mauvais pronostic.

Malgré les importants progrès thérapeutiques accomplis ces dernières années dans la prise en charge de la PR, notamment avec les biothérapies, environ un tiers des patients restent réfractaires à ces différentes biothérapies. De plus, aucun traitement efficace de l'atteinte pulmonaire n'existe à l'heure actuelle. Cette situation impose donc d'étudier de nouvelles pistes thérapeutiques.

La PR est caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale au sein de l'articulation. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins, processus appelé néoangiogénèse, contribue de façon majeure à cette inflammation par l'apport de composants pro-inflammatoires. Par analogie aux approches visant la néoangiogénèse tumorale, il pourrait être intéressant et novateur de cibler la néoangiogénèse synoviale de la PR en plus de l'inflammation.

Notre objectif est de valider le rôle fonctionnel de cibles angiogéniques et inflammatoires *in vivo* dans un modèle murin combinant une arthrite expérimentale et une atteinte pulmonaire interstitielle. En effet la physiopathologie de la PR est complexe et ne peut être appréhendée *in vitro*. Des modèles animaux sont indispensables pour reproduire ses différentes caractéristiques. Ce modèle est original car c'est le seul qui permette d'étudier à la fois l'inflammation chronique articulaire et l'atteinte pulmonaire interstitielle. Ainsi il permet de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Il s'agit d'un modèle de souris transgénique présentant un phénotype dommageable. Il n'existe pas d'autre alternative pré-clinique de PR combinant ces deux atteintes.

Cette étude nécessitera 115 souris sur une période de 5 ans, avec l'utilisation de 2 procédures: procédure 1: élevage de la lignée, et procédure 2: administration orale ou intrapéritonéale de traitements ou d'anticorps monoclonaux.

Les animaux seront sacrifiés à l'âge de 14 semaines. Nous évaluerons le développement de l'arthrite et de l'atteinte pulmonaire à l'aide de paramètres cliniques et histologiques.

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). Afin de réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse infligées, une stratégie d'observation sera mise en place. Le milieu sera enrichi par un nid de coton et une maison garantissant une observation des souris et 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.

La finalité de cette étude est le développement futur de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques ou anti-inflammatoires dans l'atteinte articulaire et pulmonaire de la PR pour remplacer ou être associées aux traitements actuellement disponibles.

16625 Les plaquettes sanguines, qui sont des petites cellules sans noyau du sang, sont avant tout responsables de l'arrêt du saignement, encore appelé hémostase, lors de la survenue d'une brèche dans un vaisseau. En revanche, lors d'une situation pathologique, elles peuvent amener à l'occlusion des vaisseaux sanguins (thrombose), entraînant par conséquent 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 sanguines expriment des récepteurs d'adhérence, d'activation mais également des récepteurs d'inhibition. Il a récemment été démontré que certains de ces récepteurs inhibiteurs sont des régulateurs essentiels de la production des plaquettes sanguines. Le but de notre étude est d'étudier l'impact de la perte de ces récepteurs sur les fonctions plaquettaires et plus particulièrement dans les fonctions, d'adhérence et d'activation des plaquettes *in vitro* et *in vivo*, notamment dans des processus complexes et intégrés que sont la thrombose, l'hémostase ou encore l'intégrité vasculaire.

Pour réaliser ces études, nous utiliserons des lignées de souris déficientes pour ces récepteurs. L'absence de ces récepteurs n'est pas délétère pour les souris et n'est pas décrit pour avoir des répercussions néfastes sur leur qualité de vie. Les expériences consisteront d'une part en des prélèvements de sang pour réaliser des mesures *ex vivo* et d'autre part en l'observation *in vivo* en temps réel de la formation du thrombus dans différents modèles de thrombose *in vivo*.

Nous serons attentifs à être en adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer Les plaquettes ne possédant pas de noyau, elles ne sont pas manipulables génétiquement et ne peuvent pas être cultivées, empêchant ainsi tout modèle reposant sur la culture cellulaire. C'est pour cela que l'utilisation d'animaux est incontournable pour réaliser ces études.

Réduire Nous maîtrisons l'ensemble des techniques utilisées, ainsi nous n'avons pas besoin d'utiliser des animaux dans des manipulations de mise au point. De plus, nous prélèverons les tissus des animaux utilisés pour les expériences afin d'obtenir des données supplémentaires *ex-vivo*. Ainsi, limiter le nombre total d'animaux nécessaires à notre recherche. 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.

Raffiner 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. Au cours des procédures, des traitements de prévention de la douleur et des anesthésies adaptées sont appliqués. 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 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. De plus, pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 1596 souris.

16626 La pollution particulaire revêt une importance environnementale et sanitaire majeure en accord avec des contraintes sociétales de plus en plus marquées. En effet, l'OMS estimait que la part de responsabilité de la pollution de l'air extérieur dans les décès prématurés était prépondérante (pathologies cardio-vasculaires et pulmonaires multiples). Dans le secteur du transport, l'amélioration des dispositifs de filtration des particules à l'échappement a contribué à faire émerger l'importance relative des particules hors combustion : particules d'abrasion des revêtements, de pneumatiques et particules de dispositifs de freinage. Ces dernières présentent notamment des concentrations relativement élevées dans les endroits clos tels que les enceintes ferroviaires souterraines comme l'a décrit l'ANSES dans la saisine du 09/2015 pointant la nécessité de pouvoir fournir aux autorités réglementaires des informations pertinentes quant à la toxicité potentielle de ces particules au regard de leur composition physico-chimique, notamment dans des études chroniques ou subchroniques. Ce

projet d'une durée de 3 ans, vise donc à améliorer les connaissances sur la toxicité des particules de dispositifs de freinage collectés par l'utilisation d'un dispositif contrôlé de génération des particules de frein (banc d'organe développé lors d'un précédent projet) et une approche toxicologique chez le rat. Peu d'études font le lien direct entre les émissions de particules de frein et leurs effets toxiques, justifié par la complexité des systèmes techniques à mettre en œuvre. L'originalité du projet réside dans l'analyse de l'ensemble de la chaîne depuis la production de particules en conditions maîtrisées et reproductibles de freinage à leurs effets cytotoxiques *in vivo*. La nature discontinue des émissions permettant difficilement de contrôler une dosimétrie lors d'une exposition en continu en phase aérosol, le choix de la voie d'exposition pour cette étude s'est porté sur l'instillation intra-nasale de particules de frein pour arriver à définir des doses toxicologiques de référence pour ces matériaux et de maîtriser l'expologie de l'animal. De même, elle a été également préférée à une approche sur cultures cellulaires, qui bien qu'ayant montrée des résultats intéressants sur cellules épithéliales pulmonaires, est dépourvue des mécanismes de défense systémique du modèle animal et de clairance pulmonaire fondamentales pour une étude de toxicologie respiratoire. Dans ces conditions, l'utilisation de l'animal est indispensable. L'approche par instillation intra-nasale des particules permettra de déterminer par des études cytopathologiques pulmonaires, la distribution particulaire et la survenue de lésions morphologiques. D'un point de vue mécanistique, la présence d'un stress oxydant et d'une réponse inflammatoire seront évaluées respectivement sur le tissu pulmonaire et sur le plasma sanguin et le lavage broncho-alvéolaire. La caractérisation du potentiel oxydant des particules de frein ainsi que leur localisation subcellulaire par microscopie électronique compléteront l'étude.

Ce projet s'articule en 2 parties.

La première partie a fait l'objet d'une autorisation de projet référencée sous le numéro APAFIS #21663-2019073118117965v5. À l'issue de cette étude préliminaire après instillation intra-nasale unique de 4 concentrations de suspensions particulaires (de 0.05 mg/kg à 5 mg/kg) comparées à un groupe d'animaux Témoin, 2 doses ont été retenues pour la seconde partie du projet. Lors de cette étude, les rats utilisés n'ont présenté aucun signe de souffrance.

Cette nouvelle demande d'autorisation de projet concerne la seconde partie du projet. Elle consistera à étudier, après instillation intra-nasale répétées ou non de particules de frein sur 2 séries d'exposition, les effets toxicologiques pulmonaire et systémique des 2 doses précédemment retenues. Comme aucune modification n'a été constatée, même à très forte concentration lors de l'étude préliminaire sur les paramètres sanguins et sur le profil cellulaire des frottis de lavage broncho-alvéolaire, les doses suivantes ont été retenues : la dose la plus faible à 0.05 mg/kg, dose correspondant à un fond urbain ambiant de 50 µg/m³ et la dose la plus forte à 5 mg/kg. Elles seront comparées à un lot de rat Témoin. Les 2 séries d'exposition se présentent ainsi : : une durée courte en phase aiguë (1 journée) et une durée longue en phase subaigüe (5 jours par semaine pendant 4 semaines). Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, les données histologies des rats utilisés lors de l'étude préliminaire pour la phase aigüe seront intégrés à cette seconde partie de l'étude.

Le nombre d'animaux est réduit au minimum et sera limité à 60 rats Wistar répartis sur 2 séries d'exposition composés de 3 lots d'animaux : un lot Témoin (liquide vecteur - sérum physiologique) et 2 lots aux doses de particules de frein retenues.

Pour limiter l'inconfort que pourrait générer l'instillation intranasale des doses de suspension particulaire, un anesthésique local sera appliqué au niveau de la sphère nasale avec une alternance sur la narine traitée pour les animaux intégrés dans la phase d'exposition de 30 jours. 24 heures après la dernière instillation, les animaux seront analgésiés et anesthésiés selon les exigences réglementaires. Des paramètres biologiques, cytologiques et histologiques seront évalués sur le tissu pulmonaire. Suivant les préconisations des 3R, une attention particulière est faite afin d'anticiper et de prévenir toute forme de souffrance chez les animaux. Notamment, une attention particulière sera faite pour les animaux ayant reçu les doses de suspension particulaire par application de points limites prédéfinis. Ce suivi sera effectué par un personnel qualifié et expérimenté. Concernant le raffinement des procédures expérimentales, un soin particulier au bien-être des animaux est dédié. Ceux-ci arrivent en livraison par un transporteur agréé. Les animaux sont pris en charge et bénéficient d'une période d'acclimatation dans un environnement climatisé entre 19 et 21°C avec accès ad libitum à l'alimentation et l'eau. Les cages (2 rats par cage), sont enrichies et conformes aux normes européennes. Les

groupes sociaux formés à la livraison seront maintenus jusqu'à la mise à mort des animaux. Pendant une période d'acclimatation d'une dizaine de jours, un entraînement quotidien sera effectué par manipulation des animaux en vue de réaliser une procédure « fantôme » d'instillation intra-nasale limitant ainsi le stress le jour de la réalisation des procédures d'exposition.

16627 L'importance de la rythmicité circadienne dans la santé humaine et le bien-être est de mieux en mieux caractérisée. Les perturbations des fonctions circadiennes sont connues pour entraîner des troubles métaboliques (obésité, diabète), des problèmes cardiovasculaires, et même certains cancers (par ex., cancer du sein chez les femmes en travail posté). La conception de stratégies pour traiter, prévenir ou retarder ces perturbations est un nouveau défi pour la science et la médecine. La plupart des connaissances en chronobiologie a été obtenue chez les rongeurs nocturnes (c'est-à-rats, souris et hamsters). Compte-tenu de la nature diurne de la vie humaine, ces données ne peuvent pas être appliquées directement dans un contexte biomédical. Comprendre comment fonctionne le système circadien chez un rongeur diurne est donc une condition nécessaire pour des applications biomédicales appropriées.

Chez les animaux nocturnes, l'activité comportementale conduit à une suppression de l'activité électrique dans les noyaux suprachiasmatiques (SCN), siège de l'horloge principale des Mammifères, qui génèrent les rythmes circadiens. Le résultat de cette suppression est que l'amplitude du rythme activité électrique des noyaux suprachiasmatiques est renforcée par l'activité comportementale de l'animal nocturne pendant la phase du cycle lumière/obscurité où il est actif.

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

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

Pour étudier les mécanismes impliqués dans la transmission du signal d'activité comportementale aux SCN, nous allons étudier le rôle de la sérotonine en tant que médiateur potentiel du signal d'activité locomotrice des SCN. Notre hypothèse est basée sur les preuves que les niveaux de sérotonine sont en corrélation avec l'activité locomotrice et que l'activité locomotrice module la libération de sérotonine. Nous étudierons également la rétroaction du rythme de prise alimentaire et/ou de la restriction calorique sur l'horloge suprachiasmatique de ce rongeur diurne.

Enfin, nous déterminerons l'impact d'un régime gras et sucré sur les oscillations circadiennes chez un rongeur diurne. Ces résultats devraient avoir des applications biomédicales car le rongeur diurne, *Arvicanthis*, est un meilleur modèle animal des troubles circadiens de l'espèce humaine.

L'investigation du cycle veille-sommeil et de la glycémie nécessite l'utilisation de modèles animaux *in vivo*, ce qui exclut l'application stricte de la règle N°3 des 3 R (= Remplacer).

Pour garantir des résultats valides sur le plan statistique (avec un seuil de significativité à $P < 0.05$), 6 animaux par traitement et par groupe seront systématiquement prévus. Ce nombre d'animaux est réduit à son minimum possible en suivant la règle N°1 des 3 R (= Réduire). L'ensemble de ce projet conduira à implication d'un total de 278 *arvicanthis* sur 5 ans. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, le projet reposera essentiellement sur la mise en place d'études longitudinales où chaque animal sera son propre contrôle. Pour le raffinement des conditions d'hébergement, les animaux seront gardés en cages individuelles pour enregistrer leurs rythmes journaliers individuels et car les congénères sont agressifs entre eux. Cependant, les cages seront ouvertes, de sorte que les animaux garderont des contacts olfactifs et auditifs avec leurs congénères maintenus dans la même pièce. De plus, chaque cage sera enrichie d'un bâton à ronger.

Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie générale ou locale selon besoin avec prise en charge péri- et post –opératoire de la douleur (traitement anesthésique locale et/ou analgésique). Des points limites prédictifs et précoces ont été établis afin d'interrompre les procédures et ainsi soustraire l'animal à la souffrance.

16628 Introduction : La peau est le plus grand organe du corps et remplit de nombreuses fonctions. Au cours du vieillissement, la qualité de la peau diminue ce qui se traduit par une perte de l'élasticité et de la tonicité du derme, une perte de volume (affaissement de la peau), une moindre hydratation et une diminution de son épaisseur. Ces changements morphologiques résultent d'une diminution de la quantité et de la qualité des fibres de collagène, d'élastine et de la production de radicaux libres. Le vieillissement cutané se produit dans les différentes couches de la peau : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

Au niveau de la peau, l'acide hyaluronique (HA) est présent de manière tout à fait naturelle et est surtout retrouvé au niveau du derme et en moindre quantité au niveau de l'épiderme. Avec le temps son taux diminue progressivement. Il est essentiel au maintien de la structure des couches de la peau, il nourrit et hydrate le collagène et plus récemment des données scientifiques lui attribuent des propriétés sur la fermeté de la peau via une stimulation des cellules souches adipocytaires impliquées dans la régénération cutanée.

Les formulations d'HA sont utilisées couramment depuis de nombreuses années en médecine corrective. Elles sont considérées comme des dispositifs médicaux, puisqu'elles sont introduites de manière invasive dans la peau, à l'aide d'une seringue, et sont destinées à demeurer en place pendant une période d'au moins trente jours. De ce fait la réglementation européenne et américaine impose de démontrer la sécurité sanitaire et les bénéfices de ces dispositifs tout en préservant l'innovation.

Objectif du projet: Dans ce projet, on se propose d'évaluer le bénéfice de formulations innovantes d'HA sur la régénération tissulaire de la peau et de son tissu adipeux chez le lapin. Différentes voies d'administration peuvent être abordées sous-cutanée (SC), intradermique (ID), intra musculaire (IM)) afin d'induire une activation du tissu cible (hypoderme, derme, épiderme, tissu adipeux, muscle). Des injections uniques ou répétées peuvent être réalisées. Le suivi de la régénération tissulaire sera réalisé par une analyse de l'expression de biomarqueurs impliqués dans ce processus, comme la production de collagène ou d'élastine et une observation histologique de la peau. Ce projet sera réalisé dans un modèle sain. Les résultats obtenus permettront de définir si une injection unique ou répétée de ces dispositifs médicaux innovants induit un bénéfice au niveau de la régénération tissulaire de la peau, plus particulièrement au niveau du derme qui se traduirait par un effet prolongé en clinique.

Avantages escomptés: Ce projet permettra de documenter la mise en place d'un processus de réparation tissulaire conduisant à une redensification/réjuvénation du derme.

Domages escomptés: Les formulations d'HA sont utilisées depuis de nombreuses années en médecine corrective et sont bien tolérées chez l'Homme. Cependant et afin d'anticiper des dommages éventuels liés à l'injection de ces formulations, des points limites précis ont été établis et serviront à garantir le bien être optimal de l'animal.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour documenter le bénéfice de ces dispositifs médicaux après une injection unique ou répétée en SC, ID, IM ou dans le tissu adipeux sous cutané.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

Choix des espèces / Méthode de raffinement :

L'espèce lapin est largement décrite dans la littérature pour documenter les bénéfices de ces dispositifs médicaux. Ils permettent une injection en ID, SC, IM ou dans le tissu adipeux en multipliant les sites d'injection par animal.

En préambule de l'étude (Procédure 2), une étude de faisabilité (Procédure 1) permettant de déterminer le volume d'injection et le nombre de site d'injection adaptés pourra être réalisée selon la nature du

dispositif médical (la capacité d'injection est dépendante de la nature du dispositif médical : propriété physico-chimique du HA, et de la localisation de l'injection). Ceci permettra d'ajuster le nombre d'animaux et de contribuer aux raffinements des études.

Nombre d'animaux :

Sur une période de 5 ans, 900 animaux maximum seront nécessaires à l'évaluation de ces dispositifs médicaux innovants dont 10% seront dédiés à l'étude de faisabilité et à la formation/ maintien des compétences aux gestes techniques.

Conditions d'hébergement et de soins: Les conditions d'hébergement et de soins utilisés ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations françaises et européennes. Les animaux sont hébergés en cage individuelle, tout en gardant un contact visuel, auditif et olfactif avec leurs congénères. Ce milieu environnemental pourra être amélioré, par un enrichissement adapté pour leur permettre de s'occuper et d'exprimer des comportements spécifiques de l'espèce, par exemple, des plateformes pour se placer en hauteur. Les animaux pourront être mis en groupe régulièrement pendant un maximum de 6 heures avant d'être replacés en cage individuelle.

Avant chaque étude, une période d'acclimatation, d'au moins 7 jours, sera appliquée.

Afin de s'assurer du bien-être animal sur la durée de l'expérimentation, des points limites ont été définis. 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, en appliquant des protocoles analgésiques pré établis.

16629 La tuberculose est une maladie infectieuse transmise par voie aérienne, causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). La probabilité de développer une tuberculose est plus élevée chez les personnes vivant avec le VIH (infection opportuniste) et parmi les personnes présentant des facteurs de risque (malnutrition, diabète, consommation excessive d'alcool et de drogues). En 2018, l'OMS a recensé 10 millions de nouveaux cas de tuberculose. Cette même année, la tuberculose a tué 1,5 million de personnes à travers le monde, faisant d'elle la première cause de mortalité parmi les maladies infectieuses.

Des traitements efficaces contre l'infection par Mtb existent, mais près de 3 millions de personnes n'y ont pas accès. Les cas d'infections résistantes aux traitements augmentent, notamment celles qui résistent à l'ensemble des médicaments actuels (infections multi-résistantes) et pour lesquels le succès thérapeutique reste faible et le pronostic médical très défavorable.

L'infection par Mtb affecte particulièrement les poumons (forme pulmonaire) mais peut également toucher d'autres organes (formes extra-pulmonaires). Après infection, la bactérie peut rester à l'état de repos dans l'organisme : ceci correspond à une infection tuberculeuse latente, durant laquelle l'individu n'est pas malade ni contagieux. Après un certain temps de latence, environ 10% des personnes infectées vont développer une tuberculose (le temps de latence est dépendant de plusieurs paramètres tels que l'âge, l'état du système immunitaire et la présence ou non de traitements). Ces individus vont alors présenter des symptômes et seront contagieux.

La vaccination par le Bacille de Calmette et Guérin (BCG) confère une protection contre la tuberculose juvénile, mais possède une efficacité de protection inférieure à 30% contre les formes de tuberculose développées chez l'adulte.

Tous ces éléments font de la tuberculose un enjeu majeur de santé publique. Ainsi, l'OMS a lancé un programme international ambitieux « END TB » avec pour objectif une réduction de 90% du nombre de décès associés à la tuberculose d'ici 2030.

Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies de vaccination, ainsi que des traitements préventifs et curatifs contre toutes les formes de tuberculose. L'infection par la bactérie Mtb et les manifestations cliniques de la maladie sont complexes et mettent en jeu un grand nombre d'acteurs tissulaires, cellulaires et moléculaires qui sont présents uniquement dans un modèle *in vivo* de l'infection. Il n'existe pas, à ce jour, de modèle équivalent *in vitro* ou *in silico*.

Cela implique le développement de modèles animaux de l'infection à Mtb capables de reproduire les modes de transmission et la diversité clinique de la maladie observée chez l'humain. Les modèles

utilisant les rongeurs infectés par Mtb ont permis de grandes avancées mais ne permettent pas de modéliser la complexité de l'infection. Les primates non humains (PNH), atteints de la tuberculose reproduisent particulièrement bien la maladie humaine du fait de leur proximité génétique, physiologique et immunologique avec l'humain.

L'objectif du projet consiste à développer, dans un premier temps, un modèle de tuberculose chez les PNH, induite par différentes souches de la bactérie infectant les humains. Ce modèle permettra dans un second temps de tester l'innocuité et l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques et préventives, en comparaison des traitements antibiotiques actuellement disponibles et du vaccin BCG.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 242 animaux sur 5 ans, chez deux espèces de PNH, le ouistiti et le macaque cynomolgus (entre 12 et 24 animaux par an et par espèce), nés et élevés en captivité dans un établissement agréé, sélectionné en concertation avec des experts internationaux. Le ouistiti va reproduire l'infection aiguë et permet de tester rapidement des molécules innovantes à un stade précoce de leur développement, après les étapes préalables d'innocuité et de pharmacologie réalisées dans les modèles murins. De plus, de par sa petite taille, le ouistiti permet de tester l'efficacité de ces molécules à des doses faibles, ce qui représente un avantage pour les molécules en voie de développement. Le modèle du ouistiti permet une évaluation de l'efficacité des molécules qui se fait essentiellement par imagerie *in vivo* et sur l'observation des signes cliniques. Cependant, les outils permettant le suivi plus précis de la physiopathologie de l'infection, et en particulier de la réponse immunitaire, sont peu développés pour le ouistiti. De plus, le ouistiti ne reproduit pas les formes latentes de l'infection qui sont observées chez l'homme. La seconde espèce (macaque cynomolgus) reproduit mieux la diversité des formes de tuberculose (aiguë et chronique, mais aussi latente, non reproduit par le ouistiti) et dispose d'un grand nombre d'outils permettant d'explorer la physiopathologie de l'infection et la réponse immunitaire de manière plus approfondie. Seules les molécules ayant montré une efficacité chez le ouistiti seront ensuite testées chez le macaque cynomolgus, ainsi le nombre d'animaux pourra être réduit en fonction des résultats obtenus chez le ouistiti. Le macaque cynomolgus va également permettre d'évaluer les biomarqueurs de l'infection et l'efficacité des vaccins et des thérapeutiques, ce qui représente un enjeu important pour les stades ultimes du développement préclinique. Dans une majorité de cas, ces biomarqueurs peuvent être ensuite directement transposables dans les essais cliniques chez l'homme.

Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera ramené au minimum nécessaire pour permettre l'évaluation et la validation statistique des résultats. Les différentes interventions : infection des animaux, biopsies tissulaires, prélèvements sanguins, prélèvements de fluides et séances d'imagerie seront effectuées après anesthésie de l'animal et incluront des procédures permettant de minimiser la douleur. Les interventions par chirurgie mini-invasive, ciblant des organes et tissus préalablement identifiés par imagerie médicale (échographie, tomographie, tomographie par émission de positons), seront privilégiées. L'observation quotidienne des animaux permettra de déceler des signes de stress ou de douleurs qui seront pris en charge immédiatement. Les vétérinaires de l'installation seront sollicités pour mettre en œuvre une solution, par exemple : par un enrichissement du milieu supplémentaire, l'administration d'antalgiques dans le cas de douleurs, la sortie de l'étude de l'animal, etc. Des critères d'arrêt généraux et spécifiques sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus comme des douleurs extrêmes, (qui ne sont pas attendues dans la cadre de ce projet) l'atteinte de ces critères amènera à interrompre l'étude pour l'animal en question. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement de leur environnement (jouet, distraction, alimentation varié, interactions positives) défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

16630 Les neurones sont des cellules extrêmement complexes, qui se connectent avec d'autres cellules pour transmettre l'information. Un élément essentiel des neurones est le cytosquelette microtubulaire, qui donne aux cellules leur forme et assure leurs fonctions. Vu que les neurones ne se régénèrent pas, ils doivent survivre tout le long de la vie d'un individu. Pour faire face à ces défis de complexité et de longévité, leur cytosquelette est constamment modifié et adapté en fonction de leurs besoins physiologiques. Une des modifications posttraductionnelles des microtubules, la polyglutamylation, a

été montrée comme étant essentielle pour la survie des neurones : ses niveaux trop élevés mènent à la neurodégénérescence chez la souris et chez l'homme.

Le but du présent projet est de tester si la perturbation de la polyglutamylation des microtubules impacte la communication inter-neuronale. En effet, les microtubules sont essentiels à cette communication, dont les défauts microtubulaires mènent à la neurodégénérescence. Nos premiers résultats sur les cultures primaires de neurones de nos modèles murins ont montré les limites de cette approche à cause de l'hétérogénéité des cultures, et nous ont poussé à entreprendre l'approche *in vivo*.

Pour cela, nous avons généré des modèles murins qui présentent les niveaux anormaux de polyglutamylation, dans lesquelles nous allons suivre l'activité neuronale *in vivo*. Nous proposons d'utiliser l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle et de tester l'activité neuronale suite à une stimulation visuelle (lumière bleue clignotante) et olfactive (bouffées d'éthyltiglate)

Pour comprendre comment les anomalies des microtubules affectent le développement du cerveau dans son ensemble et identifier les éventuels effets nocifs sur l'organisme, les expériences sur les cultures cellulaires ne sont pas suffisantes ; nous devons effectuer des études *in vivo*. Le modèle de souris est donc essentiel pour l'étude. Tous les protocoles expérimentaux ont été conçus en accord avec les recommandations internationales. Pour éviter toute douleur ou souffrance de l'animal, des protocoles analgésique et anesthésiques sont mis en place après avis vétérinaire. Une surveillance particulière est effectuée pour détecter toute souffrance et interrompre les expérimentations si les points limites (poids, comportement de l'animal) prédéfinis sont atteints. Les animaux seront placés à plusieurs par cages avec des éléments d'enrichissements afin d'améliorer leur bien-être. Nous estimons avoir besoin de générer un total de 72 souris pour les 5 ans, pour analyser l'activité neuronale dans 6 souris de 4 génotypes différents à 3 âges différents ($6 \times 4 \times 3 = 72$) pour assurer une signification statistique de l'étude.

16631 Les pertes de substances cutanées étendues causées par les brûlures (thermique, chimique, électrique), les traumatismes, et autres étiologies (ulcères...) constituent un grave problème de santé publique. Les séquelles corporelles peuvent induire une perte de fonction motrice et esthétique engendrant des difficultés à la réinsertion sociale. Le « gold standard » dans la prise en charge des pertes de substances cutanées isolés reste les autogreffes (greffe de peau mince et épaisse). Le patient est ainsi son propre donneur. La morbidité et le nombre restreint de sites donneurs restent les principaux problèmes.

Au cours des 50 dernières années, de nombreuses équipes ont essayé de concevoir un substitut dermo-épidermique pour éviter d'induire des séquelles complémentaires sur le patient (site donneur). De nombreuses difficultés sont apparues avec entre autres : la difficulté technique de mettre en place ce bio matériel, la nécessité d'utiliser des cellules autologues (pour éviter le rejet immunitaire) et une coordination parfaite entre les cliniciens et scientifiques. Notre équipe a mis en place un tel substitut dermo-épidermique. La particularité de ce projet est que l'optimisation de cette "peau artificielle" s'est faite de façon multidisciplinaire associant cliniciens (chirurgien plasticien) et scientifiques. De plus tous les constituants de cette « peau artificielle » sont GMP (Good Manufacturing Practice).

Le bénéfice attendu par la solution de recouvrement proposée (substitut cutané dermo-épidermique en bicouche) est une meilleure cicatrisation que celle observée avec des substituts exclusivement dermique ou épidermique, avec une reconstitution plus rapide de la structure cutanée. Un tel substitut dermo-épidermique permettrait de pallier le manque de disponibilité en greffons cutanés naturels pour recouvrir les lésions des patients largement brûlés, et d'améliorer la qualité plastique des cicatrices grâce à une reconstitution cellulaire plus complète que les solution artificielles monocellulaires actuelles proposées. L'étude se propose d'évaluer cette solution de recouvrement sur un modèle de plaies cutanées réalisées sur le minipig, immunodéprimé par injections de Tacrolimus, en apportant les soins médicaux nécessaires aux animaux pour qu'ils ne souffrent à aucun moment : anesthésie lors des chirurgies, analgésie lors de la cicatrisation des lésions, évaluation clinique quotidienne pour s'assurer de l'efficacité des traitements antalgiques.

Notre projet sera mené dans le strict respect de la règle des 3R.

Remplacement : tout produit à usage humain doit intégrer des recherches précliniques sur l'animal et en complément des mises au point réalisées *ex vivo*, nous devons maintenant tester nos substituts cutanés sur un modèle vivant afin d'évaluer la prise de greffe. Nous grefferons donc cette peau artificielle sur une plaie induite par un dermatome sur le modèle cochon, en faisant le suivi de la cicatrisation sur 1 mois.

Réduire : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au maximum avec la réalisation de multiples greffes sur le même cochon. Le nombre de cochons utilisé sera au maximum de 6 minipigs.

Raffinement : afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, ils seront parfaitement habitués aux manipulations et bénéficieront d'une surveillance quotidienne et tout signe anormal fera l'objet d'un signalement afin que les animaux bénéficient aussitôt de soins adaptés. Les procédures potentiellement douloureuses se dérouleront sous anesthésie générale et les animaux recevront des antalgiques en cas de nécessité au cours de leur période de cicatrisations.

A terme, les résultats de ce projet permettront de pouvoir tester ce dispositif chez l'humain pour avoir une solution pérenne pour le traitement des patients nécessitant une greffe cutanée.

16632 De nos jours, les maladies de la peau deviennent de plus en plus nombreuses. En France, plus de 2,5 millions de personnes sont atteintes de psoriasis, une maladie inflammatoire chronique. De la même façon, l'incidence de la dermatite atopique (DA), une autre pathologie inflammatoire, est-elle aussi en constante augmentation depuis ces dix dernières années.

Jusqu'à présent il n'y a pas de traitement curatif pour ces affections. Comme pour d'autres maladies inflammatoires, les traitements font appel à des anti-interleukines proinflammatoires, à des prix très élevés et qui sont associés à des effets secondaires indésirables. De nouvelles approches thérapeutiques plus spécifiques doivent donc être développées. Ceci exige une compréhension plus approfondie des acteurs moléculaires mis en jeu lors de ces processus pathologiques, afin d'aboutir à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Des études récentes montrent un profil de microARNs (des ARNs non codant de petite taille connus pour contrôler des réseaux entiers de gènes) différant entre une peau saine et une peau présentant une pathologie inflammatoire. Nous proposons d'étudier l'effet de la régulation des microARNs dans l'initiation des réponses immunitaires chez les deux types de peau. Ces données serviront de base au développement d'approches thérapeutiques dont l'objectif consistera à bloquer les effets néfastes des réponses immunitaires inadaptées.

Le projet nécessite l'utilisation d'un modèle préclinique adapté qui mime l'aspect multifactoriel de ces pathologies. Elles impliquent en effet différents acteurs cellulaires (kératinocytes, cellules immunitaires, fibroblastes), mais aussi différents systèmes physiologiques tels que la vascularisation et la réponse sensorielle. Ces différentes caractéristiques ne peuvent être reproduites dans des modèles d'études *in vitro*. En effet, l'absence d'un modèle cutané *in vitro* due à la complexité de la peau en terme de sa structure et de sa composition cellulaire rend le recours au modèle animal indispensable qui à ce jour reste irremplaçable. Le choix du modèle murin réside sur le fait que nous disposons d'une lignée transgénique invalidée pour l'expression de l'IL-22 (souris IL-22KO) qui présente des résistances au développement chronique de maladies inflammatoires cutanées et ne présente pas un phénotype dommageable. Ce modèle d'étude nous permettra d'une part de mieux comprendre les mécanismes de résistance développés contre ces pathologies et d'autre part d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Le modèle animal utilisé est parfaitement bien décrit dans la littérature et est également connu pour ne pas engendrer de dommages ou de souffrance.

Notre projet ne nécessitera pas de mise au point de tests expérimentaux, ce qui nous permet de réduire très significativement le nombre d'animaux. D'autre part si nous observons le développement de douleurs ou de souffrances chez nos modèles animaux correspondant à une douleur modérée de niveau 2 d'après Morton et Griffiths (Veterinary Record 1985;116:431-436) nous administrerons un analgésique (le Kétoprofène), à raison de 5 mg/kg, par voie intrapéritoniale dans du sérum physiologique. Le traitement sera réalisé sur une période maximale de 2 jours consécutifs. Afin de limiter le stress et la douleur des animaux, les manipulations seront réalisées par anesthésie des animaux à l'isoflurane. Un point limite prédictif a été mis en place et les animaux seront suivis

quotidiennement. Ce projet est donc en adéquation avec la règle des 3R et n'a pas été réalisé auparavant ni par notre équipe ni par d'autres groupes de recherche.

Enfin le projet se déroulera sur 5 ans et nécessitera 390 souris.

16633 Le lymphœdème est un gonflement d'une partie plus ou moins importante du corps à la suite d'une accumulation de liquide lymphatique dans les tissus conjonctifs. Il existe deux types de lymphœdèmes. Le lymphœdème primaire est une malformation du système lymphatique sous forme d'hypoplasie ou d'hyperplasie. Ce type de lymphœdème est rare. Le lymphœdème secondaire est une dégradation du système lymphatique. Le lymphœdème secondaire du membre supérieur ou inférieur, est dans les pays développés une complication sévère et invalidante du traitement chirurgical notamment du cancer du sein et du sarcome des tissus mous. Dans les pays moins avancés, la cause la plus fréquente est l'infection des ganglions lymphatiques par des nématodes ce qui conduit à la réduction du drainage lymphatique des tissus.

L'incidence du lymphœdème secondaire du membre supérieur serait ainsi comprise entre 7% pour un traitement par tumorectomie sans radiothérapie à 44 % quand on associe mastectomie et radiothérapie.

Les seuls traitements actuels disponibles sont : le vêtement de compression et le drainage lymphatique manuel.

Peu de modèle de rongeurs présentant les caractéristiques du lymphœdème existent pour étudier l'effet thérapeutique de nouvelles molécules sur ce symptôme. L'objectif de ce projet qui utilisera 300 animaux est d'obtenir un modèle animal reproductible pour évaluer le potentiel de nouvelles entités thérapeutiques de manière préventive ou curative.

Les études sont effectuées selon la règle des 3R. Pour le remplacement, aucune méthode alternative n'a été identifiée pour mimer les conditions d'obtention du lymphœdème.

Pour la réduction, le choix du nombre d'animaux est réalisé à minima de manière à obtenir une significativité statistique satisfaisante.

Pour le raffinement, le projet met en oeuvre des critères d'interruption ainsi qu'un protocole d'anesthésie au moment de créer les lots d'animaux lymphœdémateux.

16634 Le cancer du côlon est le 3ème cancer le plus fréquent chez l'humain. Les traitements du cancer colorectal par combinaison de chimiothérapies montrent un effet anti-tumoral avéré, cependant, elles ne conduisent pas systématiquement à une rémission totale du patient, en particulier dans les cas de cancers avancés. Il a récemment été montré que la modulation du système immunitaire pouvait être utilisée pour traiter le cancer. Ceci est illustré par les rémissions impressionnantes de patients atteints de cancer de la peau avancés ou de cancers pulmonaires traités avec des nouvelles thérapies impliquées dans l'activation des globules blancs. Cependant plus de 60% des patients ne répondent pas à ces nouveaux traitements, ce qui nécessite la compréhension des événements moléculaires impliqués dans cette résistance des cancers à l'action du système immunitaire. L'objectif de ce projet est donc d'étudier la réponse immunitaire dans deux modèles murins de cancer colorectal, puis de traiter ces animaux avec divers agents immunomodulateurs pour tester leur efficacité anticancéreuse. Pour cela nous travaillerons avec le modèle tumoral MC38, lignée cellulaire d'adénocarcinome colique murin dérivée de souris C57BL/6. Après injection des cellules cancéreuses, nous réaliserons soit 1) des analyses de l'infiltrat immunitaire au sein de la tumeur soit 2) un suivi de la croissance tumorale des animaux qui auront été traités ou non avec divers agents immunomodulateurs. La mise en oeuvre de ce projet permettra donc de rendre compte de l'efficacité de traitements immunomodulateurs novateurs dans ces modèles ; de mettre en lien leur effet anticancéreux avec l'état d'activation et/ou d'épuisement des cellules immunitaires. Le nombre total de souris prévues pour la mise en oeuvre de ce projet est de 120.

Notre étude, étant une investigation physiologique et impliquant la communication entre différents tissus de l'organisme (tumeur, système immunitaire de la souris), nous ne pouvons remplacer ce modèle animal par aucune méthode alternative actuelle. Le modèle tumoral utilisé a été caractérisé préalablement, ce qui permet de s'affranchir de tests supplémentaires pour définir les temps auxquels les traitements doivent être administrés. Le raffinement du protocole prendra en compte le suivi de la

taille des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse afin de s'assurer qu'elles restent inférieures à la taille classiquement utilisée comme point limite en cancérologie. Ce suivi individuel permettra la surveillance du bien-être des animaux qui seront hébergés par groupe de cinq à dix dans un établissement agréé. Le nombre d'animaux minimum requis est calculé afin d'assurer une fiabilité statistique. Aussi, afin de limiter l'utilisation de souris, nous évaluerons sur le même animal la fonction des lymphocytes et la croissance tumorale lors d'expérience nécessitant l'utilisation de traitements.

16635 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un déficit neurologique, comme une paralysie ou une difficulté à parler, de survenue soudaine, en relation avec une lésion cérébrale. Ces lésions du cerveau peuvent être du à un saignement dans le cerveau (AVC hémorragique), ou au contraire à un déficit de sang (AVC ischémique), ce qui est le plus fréquent.

Les AVC sont une cause majeure de décès et de handicap. Les causes de décès sont les suivantes: lésion cérébrale massive entraînant une compression du cerveau (50% des décès), complications liées au handicap (infection des poumons, caillot dans les veines pouvant toucher les poumons), maladies associées principalement cardiaques.

Le décès va notamment survenir en cas d'AVC de grande taille, notamment en cas d'AVC étendus du territoire de l'artère cérébrale moyenne (environ 65% de décès), et auxquels nous allons nous intéresser.

La prise en charge des patients avec un AVC ischémique comporte :

1. La thrombolyse intraveineuse

Le principal traitement médicamenteux validé pour le traitement de l'AVC ischémique est l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène ou tPA. Il permet de détruire le caillot de sang responsable de l'AVC.

2. La revascularisation mécanique par voie endovasculaire.

Le retrait mécanique du caillot est devenu le traitement de référence. Le caillot peut être aspiré par succion, ou retiré à l'aide d'un filament : c'est la thrombectomie mécanique.

La thrombectomie mécanique peut être associée à la thrombolyse par tPA. Ce traitement comporte aussi des effets indésirables : 10% des patients peuvent présenter un saignement (transformation hémorragique) (Khatri et al, Stroke 2007) dans le cerveau dans ou autour de la zone d'AVC, qui peut être source de handicap et de décès.

3. La craniectomie décompressive

Environ 1 à 10 % des patients avec AVC ischémique présentent un AVC de très grande taille. Ce type d'AVC peut écraser le cerveau et entraîner le décès. Pour éviter le décès, il peut être réalisé une procédure chirurgicale appelée craniectomie décompressive (CD). La CD consiste à enlever une grande partie de la voûte crânienne afin de contrôler le gonflement du cerveau. Le bénéfice de la craniectomie décompressive dans l'AVC de grande taille a été évalué dans plusieurs études cliniques, où il a été montré son bénéfice, mais ces études ont été réalisées avant l'avènement de la thrombectomie mécanique.

L'objet de notre étude est d'évaluer l'impact de la craniectomie décompressive sur la transformation hémorragique après échec de thrombectomie. Pour cela, nous évaluerons dans un modèle d'ischémie reperfusion chez la souris (correspondant à un AVC recanalisé par une thrombectomie) l'impact d'une CD sur le risque de TH et le risque de gonflement du cerveau par œdème. Nous allons constituer 5 groupes de souris Swiss, soit un total de 87 animaux. La prise en compte de l'analgésie et du bien-être animal sera au centre de nos préoccupations.

Le remplacement des modèles animaux n'est pas possible car la modélisation de phénomènes aussi complexes associant ischémie reperfusion, thrombolyse IV, CD ne nous paraît malheureusement pas modélisable autrement que chez le vivant.

16636 A ce jour, le tPA recombinant est le seul traitement pharmacologique de la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques.

Le tPA est également exprimé dans le cerveau, où il contrôle des fonctions critiques comme la mémoire et la plasticité synaptique. La détection du tPA neuronal dans le cortex est techniquement difficile. Ainsi, jusqu'à maintenant, c'est essentiellement sa présence dans les neurones excitateurs qui a été décrite. Cependant, de récents travaux ont montré l'expression de tPA par des interneurons inhibiteurs, et notamment ceux exprimant la parvalbumine (PV).

Les interneurons à PV représentent 50% des interneurons. Ils sont entourés d'une matrice extracellulaire (MEC) particulière, les Perineuronal Nets (PNNs), dont la mise en place clôt des périodes de plasticité. Ils sont activés par les neurones pyramidaux excitateurs dont ils contrôlent en retour l'activité. Il a été montré qu'une destruction des PNNs par des enzymes bactériennes permettrait un retour de la plasticité. Le tPA, par son activité protéasique, pourrait donc contrôler le métabolisme des PNNs et ainsi moduler la plasticité et l'équilibre entre neurotransmissions excitatrices et inhibitrices, avec donc des enjeux cliniques potentiels.

Notre projet vise à comprendre le(s) rôle(s) du tPA exprimé par les interneurons PV dans des mécanismes de plasticité et de définir si ce(s) rôle(s) est(sont) dépendant(s) des PNNs. Pour cela, nous utiliserons deux protocoles d'étude de la plasticité - la privation monoculaire et le « whisker trimming » chez plusieurs souches de souris : Swiss WT, tPANULL (entièrement déficientes en tPA) et leur contrôle WTNnull, tPAPV- (spécifiquement déficientes en tPA dans les PV) et leur contrôle tPAPV+.

Cette étude est basée sur l'expérimentation animale et prend en compte la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-après.

- Les modèles de privation monoculaire et de « whisker trimming » sont utilisés régulièrement par la communauté scientifique s'intéressant à la plasticité cérébrale. Les rongeurs sont les animaux les plus utilisés pour l'étude des mécanismes de plasticité, et en ce sens, la souris est particulièrement adaptée, car il existe de nombreuses souches génétiquement modifiées. Par ailleurs, ces deux modèles sont des approches mini-invasives, donc avec un niveau de souffrance peu élevé.

- Pour notre projet, il n'existe pas de modèle de substitution *in vitro* ; il est donc indispensable d'utiliser des procédures *in vivo* ; cependant le design expérimental a été particulièrement étudié pour garantir une réduction optimale du nombre d'animaux. Ce projet nécessitera 435 animaux (souris mâles, swiss ou déficientes en tPA, âgées de 8 semaines, de 28 à 32 jours ou de P0 à P31 jours, selon les procédures).

- 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 poids >15% du poids initial, apathie...), celui-ci serait immédiatement retiré du protocole et euthanasié selon la procédure « Mise à mort » décrite dans le paragraphe 3.3.3.

16637 Les diarrhées associées à des infections bactériennes se caractérisent par une gastro-entérite, plus précisément une rectocolite aiguë. Elles se transmettent par voie féco-orale, principalement dans les pays en voie de développement ou chez les voyageurs. Chaque année, elles tuent plusieurs millions de personnes, essentiellement des enfants de moins de 5 ans. La shigellose et le choléra sont responsables d'une vaste majorité de ces cas. Il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin commercialisé protégeant des infections par *Shigella*, mais de nombreuses approches sont en cours d'étude. La shigellose est due à des bactéries appelées shigelles réparties en quatre espèces (*Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*). *Shigella* est une bactérie à Gram négatif virulente infectant le colon humain et l'intestin grêle respectivement et provoquant des diarrhées. *Vibrio cholerae* est le principal pathogène responsable du choléra.

Aucun vaccin contre *Shigella* n'est commercialisé, notamment du fait de l'absence d'un modèle animal d'infection qui permettrait d'évaluer leur efficacité. Aucun modèle animal de choléra n'existe aujourd'hui. Cette phase d'étude dite préclinique bénéficiera de ces modèles.

Nos équipes de recherche ont étudié pendant de nombreuses années la virulence de *Shigella* dans divers modèles animaux (primate, lapin, souris, cobaye) qui, même imparfaits ont permis de mieux comprendre les mécanismes de la virulence de ce pathogène. Toutefois, aucun d'entre eux ne permet de récapituler l'infection du colon suite à l'ingestion de *Shigella*. Le modèle le mieux accepté

actuellement est l'infection intrarectale à hautes doses chez le jeune cobaye (3 semaines). La phase aiguë (8h) est observée, cependant les animaux éliminent naturellement les bactéries après 24-48h. Des animaux plus âgés (5 semaines et plus) ne sont plus sensibles à l'infection, ce qui rend impossible d'éventuels tests d'immunisation avec des candidats vaccin (durée entre 2 et 9 semaines).

Dans ce projet, nous réaliserons des infections par *Shigella* et *Vibrio cholerae* chez le cobaye carencé modérément en ascorbate. Pour cela, nous utiliserons le régime alimentaire que nous avons validé. Les carences modérées en ascorbate n'induisent pas de souffrance des animaux, qui ont des croissances similaires aux animaux contrôles. Ce modèle est justifié par deux observations historiques : a) seuls les mammifères incapables de produire la Vitamine C (ascorbate) sont susceptibles à l'infection par *Shigella* (homme, primate et cobaye) ; b) des corrélations ont été observées dès le XVIIIème siècles entre dysenterie et scorbut chez des individus sévèrement carencés en ascorbate (marins, militaires).

Ces modèles pourront être utilisés pour évaluer l'efficacité de candidats vaccin actuellement en phase de développement et permettront une rationalisation des coûts et des efforts pour la commercialisation de vaccins efficaces contre ces bactéries pathogènes.

Le niveau de sévérité attendu est modéré. L'infection des cobayes carencés modérément en ascorbate avec *Shigella* ou *Vibrio cholerae* n'est pas létale, jusqu'à 30h post-infection, et n'entraîne pas de perte de poids supérieure à 20% durant cette période.

Les inoculations bactériennes intrarectales sont réalisées sous anesthésie pour limiter la douleur subie par les animaux. Les infections orales seront réalisées sur animaux vigiles, puis l'infection est étudiée après le réveil des animaux. Nous analyserons les réponses inflammatoires et la destruction de la barrière épithéliale intestinale au niveau de l'ileum et du colon (*Shigella* et *Vibrio cholerae*) pour évaluer le caractère invasif et virulent des souches testées. Les dosages d'ascorbate plasmiqes seront également réalisés. Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude.

Le recours à l'animal est nécessaire car les modèles cellulaires d'infection de *Shigella* et *Vibrio cholerae* ne rendent pas compte de la modulation des mécanismes de virulence de ces pathogènes dans le contexte inflammatoire. Notamment, les neutrophiles meurent dans les 6 heures post-purification hors de l'organisme vivant.

Au total, au cours des 5 prochaines années, 84 (72 pour *Shigella*, 12 pour *Vibrio cholerae*) cobayes (femelle, modèle utilisé en routine au laboratoire, plus sensible à l'infection par *Shigella*) seront utilisés dans le cadre de ce projet contenant une procédure. Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Nous avons conçu ces procédures avec un biostatisticien pour être sûrs d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé.

Les cobayes femelles seront maintenus dans un environnement protégé pour réduire le risque d'infection. Elles seront hébergées en groupe de 2 avec une litière appropriée avec des enrichissements (cobayes). Des points limites ont été identifiés, pour réduire au minimum la souffrance animale (les animaux seront surveillés étroitement et mis à mort si ces points limites sont atteints).

16638 Notre thème de recherche est centré sur l'étude fonctionnelle d'une Sélénoprotéine exprimée par les cellules neurales au cours de leur mise en place. Cette protéine participe au contrôle de l'homéostasie redox et pourrait être impliquée dans le contrôle des processus nécessaires à la mise en place du système nerveux, comme les processus de neurogenèse, de migration, voire de différenciation des neurones. L'objectif de ce projet est d'analyser les niveaux d'expression de cette protéine lors du neurodéveloppement et durant la période postnatale, au sein de différentes structures cérébrales. Nous savons que l'absence de cette protéine au niveau cérébral se traduit par des altérations comportementales chez la souris adulte. Ainsi, connaître les niveaux d'expression de cette protéine nous permettra d'appréhender sa participation physiologique chez la souris sauvage, C57BL/6J. L'analyse sera réalisée au niveau messenger par RT-qPCR après microdissection laser, ainsi qu'au niveau protéique par western blot. Ce projet est réalisé en parallèle d'un modèle d'électroporation in utero, visant à invalider cette protéine lors de la mise en place du cortex. Il est donc nécessaire de connaître son profil d'expression dès le stade embryonnaire. Cette analyse nécessite des prélèvements

post-mortem à différents stades de vie de l'animal, allant de l'embryogenèse (E12) à un an de vie. Cet intervalle de temps nous permettra alors de connaître sa participation lors de la mise en place du système nerveux, son rôle au sein du cerveau mature, ainsi que sa possible contribution vers la fin de vie de l'organisme. La distinction entre les mâles et femelles sera également nécessaire puisque les hormones sexuelles modifient la physiologie de l'animal. Enfin, des immunohistofluorescences contre notre protéine seront réalisées afin de visualiser spatialement son expression, ainsi que des cultures cellulaires de neuroblastes pour analyser l'effet de l'invalidation de notre protéine sur leur morphologie et leur motilité. A raison de 12 animaux par stade, 154 souris seront nécessaires pour l'analyse des messagers, 79 pour l'analyse protéique, 45 animaux (6 animaux représentant 3 souris par sexe, pour 5 stades de développement) pour l'immunohistofluorescence et 95 souris (12 femelles générant des embryons) pour la culture cellulaire, soit un total de 393 animaux générés pour l'ensemble des analyses. Les souris de stades de développement intermédiaire (premières semaines de vie à jeune adulte) seront générées par des souris prélevées plus tardivement (6 mois et 1 an), afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les souris seront hébergées dans un milieu adapté à leur physiologie, à 22°C et sous un cycle jour/nuit 12/12. Leur litière sera enrichie, avec un accès illimité à l'eau et à la nourriture et seront surveillées quotidiennement par du personnel qualifié afin de déceler le moindre signe de souffrance ou point limite. Le nombre de souris par cage sera accordé selon la législation pour éviter un stress social.

16639 Cette formation a pour objectif de former à la microchirurgie, les internes en chirurgie, les vétérinaires, et les scientifiques disposant d'une habilitation à la pratique de la chirurgie expérimentale. Ceci en réalisant sur le petit animal des procédures impliquant des vaisseaux sanguins, des tendons, des nerfs... Ces procédures sont notamment nécessaires à la réalisation de pratiquement tous types de macro- ou de microchirurgie humaine. La formation prévoit d'avoir recours à des rats avec lesquels seront mis en oeuvre essentiellement des dissections et des anastomoses de vaisseaux sanguins. En effet, la taille des vaisseaux sanguins des rats correspond par exemple à la taille des vaisseaux d'une main humaine. La formation, validée par l'obtention d'un diplôme universitaire est effective depuis plus de 15 ans, et cette demande est la prolongation d'une autorisations initiale arrivant à échéance. Le DU se déroule sur une année universitaire à raison de 20 séances obligatoires par étudiant, chacun d'eux disposant d'un animal par séance; 260 rats sont prévus par an en se basant sur un maximum de 10 étudiants inscrits pour l'année. Il faut rajouter 30 rats pour l'examen final qui nécessite 3 rats par étudiant, et une trentaine de rats supplémentaires pour les démonstrations réalisées par les formateurs et pour palier les cas de décès accidentels d'animaux. Pour 5 ans, il faut donc compter un maximum 1300 rats. Remplacer: L'exercice de la chirurgie nécessite de travailler avec des animaux vivants de façon à appréhender toutes les contraintes liées à cette pratique: conditions d'aseptie, induction et maintien de l'anesthésie, sang circulant... Réduire: Un seul animal par étudiant et par séance est autorisé, sauf accident d'anesthésie par exemple. Par ailleurs, une partie des animaux consiste en rats 'réutilisés', provenant de formations réglementaires à l'expérimentation animale réalisées sur le site tous les ans (procédures légères). Raffiner: Les procédures mises en oeuvre sont toutes réalisées sous analgésie et sous anesthésie et encadrées par des personnes compétentes (chirurgien, personnels habilités de la plateforme pratiquant en routine des procédures chirurgicales avec les rats). Les stagiaires disposent tous d'une expérience préalable de la chirurgie humaine et/ou expérimentale. Par ailleurs, lors des premières séances, des sutures sont réalisées sur du matériel inerte (compresses). Les animaux sont élevés en groupes sociaux harmonieux dans des cages disposant d'une mezzanine et leur environnement est 'enrichi' (Papier, tubes plastiques).

16640 Le projet consiste à développer différents vaccins contre le SARS-CoV2 (COVID-19), HIV (SIDA) et Influenza (Grippe) et à définir les meilleures compositions et voies d'injections. En l'état actuel des connaissances technologiques, il n'est pas possible de réaliser ce type d'expérience totalement *in vitro* et donc de remplacer l'utilisation d'animaux, notamment en ce qui concerne l'induction de réponse immunitaire primaire. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les formules moléculaires seront analysées et présélectionnées par une série d'essais *in vitro* sur cellules immunitaires en culture. La sélection des meilleurs candidats de formules moléculaires pour leur administration chez la souris cela contribuera donc à réduire le nombre d'individus inclus dans l'expérimentation animale et d'affiner le

protocole d'immunisation en fonction de type de réponses immunitaires désirées. Seules les formules présentant un intérêt entreront dans les immunisations chez la souris. Un calcul des effectifs nécessaires basé sur une variable biologique simple (production d'anticorps) nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum d'animaux. Enfin, les contrôles positifs (antigène immunogène connu) seront co-administrés avec les Ag testés, réduisant encore les animaux nécessaires. Afin de raffiner notre approche *in vivo*, les effets toxiques et inflammatoires potentiellement délétères pour les animaux seront aussi testés *in vitro*. De plus, les animaux seront toujours hébergés en groupes avec un enrichissement du milieu. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. L'utilisation d'analgésique sera réalisée si nécessaire et suivant les procédures décrites dans ce projet afin de réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse de l'animal. Pour ce projet, nous utiliserons 1520 souris.

16641 Les maladies cardiovasculaires sont responsables d'un tiers 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. Ces artères en se ramifiant pour irriguer le myocarde, se divisent en vaisseaux de plus en plus petits. Il s'agit de microvaisseaux.

Il a été démontré qu'au fur et à mesure que l'artère coronaire se rétrécissait, le débit de repos restait inchangé, alors que le débit maximal (obtenu en injectant un vasodilatateur ou en effectuant un effort) diminuait progressivement. La réserve coronaire (CFR, coronary flow reserve) est le terme utilisé pour décrire la quantité de débit sanguin supplémentaire qui peut être fournie au cœur par rapport au débit sanguin de base. La mesure de la CFR inclut donc l'évaluation des macrovaisseaux ainsi que celle des microvaisseaux. La CFR peut être mesurée par Doppler intra coronarien, thermodilution ou par tomographie par émission de positron (TEP). Cependant ces techniques sont soit invasives soit onéreuses.

Ces dernières années, la tomographie par émission monophotonique (TEMP) utilisant des traceurs de la perfusion myocardique marqués au Tc-99m ou au Thallium-201 a été proposée comme alternative pour l'évaluation de la CFR. Néanmoins, cette méthode reste complètement à développer en préclinique.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un protocole pour l'évaluation non invasive de la CFR chez le petit animal en utilisant la méthodologie TEMP et le 99mTc-SESTAMIBI comme radiotracer.

Développer cette méthodologie chez le petit animal permettrait son utilisation dans de nombreux travaux de recherches reliés à l'études des maladies coronariennes, comprenant notamment le développement de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant la microcirculation.

Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Au total 24 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 trois, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis 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.

16642 Les théories sur le fonctionnement du cervelet proposent que le cervelet des mammifères utilise une copie de la commande motrice pour prédire les informations sensorielles qui vont être générées pendant le mouvement et les annuler. Néanmoins, la base neuronale de ce fonctionnement reste à décrire, principalement car il est techniquement difficile de séparer la réponse sensorielle produite par le mouvement et la copie d'efférence à l'origine de ce dernier. Par conséquent, le débat est toujours ouvert sur la manière dont le cortex cérébelleux permet la coordination des mouvements, y compris lors d'une tâche relativement simple comme la marche.

Le but de notre projet est donc d'étudier comment les informations motrices et sensorielles sont traitées, séparément puis de façon combinée, par le cervelet. L'intégration des informations sensorimotrices générées au niveau de la moelle épinière par le cervelet met en jeu un vaste réseau neuronal complexe. Pour étudier les mécanismes impliqués dans ce processus, il est donc primordial de réaliser des expériences sur animal entier afin de conserver la structure et l'activité des réseaux neuronaux sous-jacents. Nous réaliserons donc des expériences *in vivo* chez la souris et nous enregistrons l'activité des neurones du cervelet lors de différentes tâches motrices et sensorielles.

Des injections de virus modifiés permettant de suivre l'activité des neurones, seront réalisées sous anesthésie générale pour réduire la douleur. Ces souris seront testées dans différentes conditions de locomotion (mouvement simple des membres, locomotion sur roue, locomotion fictive) non dommageables, puis seront mises à mort. Les tissus cibles seront prélevés en post mortem.

Notre expertise permet pour la première fois de dissocier l'information sensorimotrice produite par un mouvement simple en ses composantes motrices et sensorielles individuelles. Nous serons ainsi en mesure, à terme, de démontrer comment le cervelet est capable d'orchestrer le mouvement dans des conditions physiologiques. Ces nouvelles connaissances permettront une meilleure compréhension des mécanismes des maladies du cervelet.

Nous comptons utiliser 600 animaux en 5 ans. Nous utiliserons les tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats exploitables à partir du plus petit nombre d'animaux possible. L'optimisation des soins aux animaux nous permettra d'utiliser certains animaux pour plusieurs sessions d'enregistrement et de réduire le nombre d'animaux. Pour éviter toute souffrance, tout signe de douleur, angoisse ou stress chez les animaux sera soulagé avec des analgésiques. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée.

La surveillance quotidienne de l'animal permettra d'arrêter toute procédure expérimentale en cas de signes d'anxiété ou de souffrance définis dans l'échelle d'évaluation.

16643 La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est la maladie rénale d'origine génétique la plus fréquente (1/2500 à 1/1000 naissances). Cette affection, principalement liée à une mutation du gène PKD1, est caractérisée par la prolifération des cellules tubulaires rénales entraînant la formation de kystes qui détruisent progressivement le rein. La PKRAD est responsable de 10% des cas d'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) dans le monde, nécessitant le recours à la dialyse ou à la transplantation, qui restent des traitements de suppléance coûteux et lourds pour les patients. Actuellement, aucun traitement ne permet de bloquer la formation des kystes et de prévenir l'évolution vers l'IRCT.

La formation des kystes est un mécanisme complexe faisant intervenir différents types cellulaires et un remodelage de l'architecture rénale qui ne peut, en l'état actuel des connaissances, être reproduit *in vitro* ou en utilisant des organismes simples. La dissection des mécanismes physiopathologiques à l'origine de la formation des kystes nécessite donc le recours à des modèles animaux principalement murins : ils sont encore peu connus mais il est clairement établi que le cil primaire, petite organelle située à la surface de la cellule tubulaire rénale, y joue un rôle central. Dans le cadre de la PKRAD, il a été montré que l'ablation génétique du cil primaire chez la souris prévient de façon spectaculaire la formation de kystes rénaux. Cependant, la nature des signaux contrôlés par le cil entraînant la formation des kystes n'est pas connue.

Chez la souris comme chez l'Homme, le développement spontané des kystes est très variable rendant difficile l'étude des étapes initiales de la kystogénèse. Cependant, des données récentes indiquent que l'obstruction du flux urinaire déclenche la formation de kystes rénaux chez la souris de manière très précoce. Ce modèle rend donc possible l'analyse des mécanismes d'initiation de la kystogénèse.

Les tubules sont entourés d'une fine enveloppe fibreuse appelée membrane basale tubulaire, constituée d'un réseau complexe de protéines permettant le maintien de la structure du tubule rénal. Cette membrane basale est le principal déterminant de la résistance du tubule à la distension. La dilatation tubulaire précoce observée en réponse à l'obstruction tubulaire chez les souris mutantes pour PKD1 apparaît donc liée à une modification des propriétés mécaniques de cette enveloppe qui se distend de façon excessive en réponse à l'obstruction. Cette distension est détectée très précocement

avant que les cellules tubulaires ne commencent à proliférer, suggérant que cette modification des propriétés de la membrane basale pourrait être à l'origine de la kystogénèse.

L'objectif de l'étude proposée ici est de déterminer les mécanismes à l'origine du remodelage de la membrane basale tubulaire au cours de la PKRAD.

Pour cela, nous utiliserons principalement 3 lignées de souris génétiquement modifiées, l'une déficiente en PKD1 et deux autres déficientes en PKD1 et ne pouvant pas former de cil primaire sur les cellules tubulaires afin d'étudier l'effet de l'ablation associée du cil sur la dilatation tubulaire post-obstruction. La délétion de ces gènes sera induite par l'administration de doxycycline dans l'eau de boisson.

Ces souris seront soumises à un modèle d'obstruction chirurgicale d'un des deux uretères qui est un modèle très utilisé pour étudier les pathologies rénales. L'intervention est de courte durée (5 minutes) et n'entraîne pas d'insuffisance rénale. Dans certaines expériences, les souris recevront des traitements visant à prévenir le remodelage de la membrane basale qui seront administrés par la voie la moins contraignante possible pour l'animal (injection intrapéritonéale, gavage ou, si possible, mélange à l'alimentation).

Divers examens d'immunomarquages, de microscopie et de zymographie seront conduits sur les reins après prélèvements pour l'étude du remodelage de la membrane basale tubulaire.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, l'étude sera conduite avec un effectif d'animaux réduit au minimum pour des conclusions robustes. Les procédures sont raffinées par l'emploi de points limites précoces et de traitements analgésiques. Les interventions chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et suivies d'une analgésie post opératoire.

L'analyse des enzymes à l'origine du remodelage de la membrane basale se fera en première intention à l'aide de modèles *in vitro*, afin de limiter le recours à l'expérimentation animale.

Le nombre maximum d'animaux est évalué à 1410 souris sur 3 ans. Pour réduire ce nombre, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace.

Les résultats obtenus devraient permettre d'identifier une ou plusieurs cibles thérapeutiques empêchant le développement des kystes et le déclin de la fonction rénale chez les patients.

16644 La microchirurgie (chirurgie sous microscope opératoire) est une technique utilisée dans de nombreuses disciplines chirurgicales dont la chirurgie de la main, la chirurgie plastique, en chirurgie orthopédique et traumatologique, en neurochirurgie et en chirurgie pédiatrique. Or pour être parfaitement maîtrisée, la technique microchirurgicale nécessite un entraînement long, régulier et progressif et cet apprentissage ne peut se faire qu'en laboratoire.

La formation est obligatoire dans certaines disciplines chirurgicales, telle que la chirurgie de la main et la chirurgie plastique, mais elle est également très utile pour tous les internes en chirurgie, quelle que soit leur future spécialité. C'est une technique rigoureuse qui n'accepte aucune approximation. Cette rigueur et cette précision permettent au chirurgien l'acquisition d'une grande technicité qui lui sera très utile pendant toute sa carrière.

L'utilisation des rongeurs dans la formation est nécessaire car actuellement aucun simulateur n'est capable de reproduire la complexité des structures des organismes vivants (organes in-vivo, réseaux vasculaires complexes) ainsi que les facteurs thrombogènes du flux sanguin.

L'objectif de ce projet est d'assurer la formation à la technique microchirurgicale de 130 chirurgiens et vétérinaires par an. 2 niveaux d'apprentissage sont organisés : Un niveau "initiation" qui permet aux étudiants de comprendre les principes de base mais ce cours ne leur permet pas de maîtriser la gestuelle. Pour le deuxième niveau, il s'agit d'un cours de 30 séances de travaux pratiques sur l'animal vivant, soit un enseignement portant sur 120 heures en laboratoire. Ce nombre d'heures a été déterminé suite à une analyse du taux de réussite à l'examen de fin d'année en fonction du nombre d'heures d'entraînement. A l'issue de la formation les apprenants doivent parfaitement maîtriser les techniques, aucune erreur n'étant acceptable chez le patient. Pour atteindre cet objectif nous utilisons la méthode pédagogique consistant à varier les exercices et à augmenter les difficultés techniques au fur et à mesure des séances. Afin de recouvrir l'ensemble du programme, cette demande d'autorisation de projet comporte 6 procédures réalisées chez le rat. Ces procédures consistent en des dissections

et des sutures de différents vaisseaux : aorte, veine cave, vaisseaux rénaux, vaisseaux fémoraux, carotide, veine jugulaire externe, veine porte, artère caudale et vaisseaux épigastriques. Une septième procédure est réservée à la mise au point de techniques microchirurgicales chez le rat et la souris.

Ainsi, la réalisation de ces différentes procédures va permettre aux étudiants d'aborder plusieurs difficultés qu'ils rencontreront chez le patient : des sutures de vaisseaux de diamètre et de qualités différentes - Des dissections plus ou moins difficiles des vaisseaux, certains se spasmodisant très facilement - Des durées d'ischémie limitées obligeant les étudiants à réaliser des sutures rapidement - Pendant la formation ils découvriront également toute l'importance de ne pas être uniquement focalisé sur le champ opératoire mais de bien respecter l'ensemble des tissus environnants. Chaque procédure a été soigneusement choisie afin de permettre aux étudiants d'apprendre pas à pas tous les rudiments de la microchirurgie.

Dans le respect de la règle des 3 R, nous utiliserons le moins d'animaux possible tout en suivant les recommandations émises par un groupe international d'experts en formation à la microchirurgie. En particulier, avant toute utilisation d'animaux vivants, plusieurs exercices seront réalisés sur des tissus inertes (compresses, tube en plastique, cuisses de poulet). Aussi avant toute utilisation d'animaux vivants dans la mise au point de techniques, plusieurs dissections seront faites sur des animaux fraîchement décédés utilisés dans les autres procédures. De plus, l'apprenant ne peut s'inscrire à la formation longue diplômante que s'il a préalablement effectué une formation initiale.

Tous les animaux seront anesthésiés de façon adaptée et une prise en charge de la douleur sera réalisée.

Afin de réaliser l'ensemble du programme pédagogique tout en utilisant le moins d'animaux possible, le projet prévoit l'utilisation de : 2465 rats/an et 120 souris pour former 130 étudiants/an, soit au total: 12325 rats et 600 souris pour former 650 étudiants.

16645 La pandémie à coronavirus SARS-Cov2 apparue en Chine en décembre 2019 (COVID-19) a remis au premier plan le syndrome de détresse respiratoire (SDRA), une maladie aiguë où le poumon n'est plus fonctionnel et ne peut plus assurer l'oxygénation et la décarboxylation (élimination du gaz carbonique) du sang. Lorsque cette maladie est sévère, le patient doit être placé dans un coma artificiel et mis sous ventilation artificielle mécanique. Cette ventilation mécanique est réalisée grâce à une sonde d'intubation trachéale dans les premiers jours, puis nécessite la réalisation d'une trachéotomie.

Lorsque le besoin de la ventilation mécanique excède 10 jours, la sonde d'intubation peut être la cause de complications qui lui sont spécifiques : ulcères, atrophie des muscles pharyngo laryngés pouvant conduire à l'apparition de trouble de la déglutition, d'inconfort pour le patient, de difficulté au sevrage de la ventilation mécanique et de lésions cicatricielles. Afin de prévenir ces complications, une trachéotomie est réalisée. Celle-ci permet de préserver les voies aériennes supérieures, améliore le confort du patient, et peut permettre une sortie du coma artificiel plus rapidement. Cependant la réalisation d'une trachéotomie entraîne une dissémination de gouttelettes exposant le personnel soignant à un risque infectieux dans un contexte de SARS-Cov2. Deux modalités de trachéotomie existent à ce jour : chirurgicale (on incise la trachée pour introduire la sonde d'intubation) et percutanée (à travers la peau, sans incision chirurgicale). Il n'existe à ce jour pas de consensus pour savoir quelle technique privilégier, car aucune étude n'a comparé l'aérosolisation générée au cours de ces 2 méthodes.

Le modèle animal de cochon est utilisé pour sa similitude avérée, en termes d'anatomie cervicale et d'hémodynamique, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique. L'adaptation à l'environnement physiologique direct du larynx et du cœur nous conduit à réaliser cette étude sur un modèle animal où toutes les contraintes seront présentes (impossibilité de remplacement). Le choix d'un modèle sur gros animal s'impose pour pouvoir implanter un poumon artificiel en dérivation.

Réduction : Ce projet utilisera 12 porcs adultes (poids = 50-60kg) permettant ainsi une étude statistiquement exploitable. Afin de réduire au maximum le nombre de cochons nécessaire, nous avons décidé d'associer 2 projets différents sur le même modèle porcin de détresse respiratoire aiguë (étude de 2 méthodes de trachéotomie et de 2 méthodes de ventilation assistées), les animaux seront donc, au cours de la même anesthésie utilisés pour une deuxième étude pour tester différents modes de

ventilation assistée. Nous avons constitué un seul et même schéma expérimental adapté aux 2 études. De plus, ce modèle est déjà en place et maîtrisé dans notre structure.

Raffinement des méthodes : 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 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. Nous avons établi des points limites suffisamment précoces pour éviter toute souffrance à l'animal : la fréquence cardiaque, respiratoire et sa pression artérielle sont suivies en continu. Toute modification de ces paramètres (majoration de 10% de la fréquence cardiaque, de la tension artérielle et de la fréquence respiratoire) signalera un réveil, une douleur ou un inconfort de l'animal et induirait alors un réajustement immédiatement des traitements anesthésiques. A la fin de ces études, l'anesthésie sera poussée permettant ainsi une mise à mort de l'animal sans reprise de conscience. Des prélèvements de tissus cibles serviront aux analyses biologiques post mortem.

16646 Les maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington 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 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 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.

Dont le premier objectif consiste à tester la surexpression de l'enzyme/protéine dans la maladie de Huntington (MH) au moyen de différents vecteurs viraux ciblant différentes régions du cerveau (hippocampe, striatum) dans un modèle murin pour la MH afin d'évaluer l'effet du traitement sur l'épileptogénèse.

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 77 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 virus à injecter et les temps d'analyses.

Raffinement: Enfin, 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.

16647 Ce projet a pour but d'étudier l'implication des cellules immunitaires au cours de la maladie Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Cette maladie neurodégénérative touche les neurones moteurs et entraîne une paralysie progressive et la mort des patients en moyenne 2 à 5 ans après le diagnostic sans qu'aucun traitement curatif n'existe à ce jour. Nous utilisons des modèles de souris de cette maladie pour étudier les mécanismes pouvant entraîner la mort des neurones dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et des biomarqueurs de la maladie. Nous aurons recours à quatre lignées de souris modélisant la SLA pour ce projet qui utilisera 869 souris sur une durée de 5 ans. Tout au long de ce projet, nous nous assurerons de mettre en œuvre les règles de remplacement, réduction, et raffinement (3Rs). Concernant le remplacement, ces modèles sont actuellement les seuls qui permettent de reproduire la paralysie progressive chez l'adulte et donc de modéliser la physiopathologie humaine, raison pour laquelle notre projet nécessite l'utilisation de souris. Concernant la réduction, nous utiliserons le nombre d'animaux minimal nous permettant d'obtenir un résultat statistiquement significatif afin de pouvoir obtenir une conclusion scientifique à l'ensemble de nos travaux. Dans un souci de raffinement, toutes les précautions seront prises afin de n'imposer aucune souffrance ou une contrainte minimale aux souris utilisées. Notamment, pour les procédures qui requièrent des injections elles seront faites par le personnel qualifié de l'équipe en réduisant le temps de constriction de l'animal au temps minimum nécessaire pour l'injection et utiliserons du matériel stérile et adapté aux souris. Pour la procédure qui requière une chirurgie, elle sera faite par un expérimentateur ayant suivi la formation de bonnes pratiques en chirurgie, sous anesthésie et avec utilisation d'un analgésique pour minimiser au maximum la douleur. Nous avons, pour chaque procédure, défini un point limite. De plus, un programme d'enrichissement sera suivi en ajoutant dans la cage les éléments suivants : « Mouse house » ou carrés de coton pour nids.

16648 L'hypertension artérielle (HTA) est une maladie multifactorielle et hétérogène très fréquente qui constitue un facteur de risque cardiovasculaire majeur. Il est important d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires et acteurs cellulaires impliqués dans le développement de cette pathologie pour soigner les malades qui résistent aux traitements disponibles. Différentes données de la littérature scientifique suggèrent l'implication du récepteur PDGFRalpha ainsi que des progéniteurs vasculaires exprimant ce récepteur dans le développement de cette pathologie et du remodelage vasculaire associé. Le but de cette étude est de démontrer le rôle de cette voie et de ces cellules dans l'altération de la fonction et de la structure des vaisseaux conduisant au développement de l'hypertension artérielle. De plus, de nombreuses études ont montré que les femmes sont protégées contre le développement de l'hypertension artérielle jusqu'à la ménopause mais qu'elles développent ensuite une augmentation de la pression artérielle liée à une augmentation de la rigidité des vaisseaux et une altération de leur structure. Les mécanismes impliqués dans la protection des femmes avant la ménopause sont mal connus, mais les hormones sexuelles oestrogènes et testostérone semblent jouer un rôle important. Nous étudierons les interactions entre la voie PDGFRalpha et le sexe dans le développement de l'hypertension artérielle. Nous allons 1/ étudier des modèles de souris transgéniques permettant d'activer ou d'inhiber cette voie dans des conditions normales ou d'hypertension artérielle, 2/ de suivre le devenir de ces progéniteurs dans les vaisseaux dans un modèle d'hypertension chez la souris, et 3/ d'étudier le rôle des œstrogènes et de la testostérone dans la participation de cette voie au développement de l'hypertension artérielle.

1. L'activation ou l'inhibition du récepteur *in vivo* sera réalisée soit au moyen de modèles de souris transgéniques soit par injection (i.p.) d'un activateur ou d'un inhibiteur du récepteur. Nous déterminerons si l'activation du récepteur induit l'HTA et si son inhibition retarde l'apparition de l'HTA. Après 2 à 6 semaines (selon les modèles), nous mesurerons la pression artérielle et étudierons le remodelage vasculaire par histologie et immunofluorescence sur les gros et moyens vaisseaux.

2. Nous suivrons le devenir des progéniteurs vasculaires en induisant leur marquage fluorescent dans des lignées de souris puis en induisant l'hypertension artérielle soit par infusion d'angiotensine 2 soit par infusion de PDGF-AA.

3. Nous étudierons le rôle des hormones sexuelles dans le développement de l'hypertension induite par l'activation de PDGFRalpha. Après castration de souris mâles et femelles, nous induirons l'activation du récepteur PDGFRalpha et mesurerons la pression artérielle. Les souris castrées ou non seront aussi traitées avec des hormones sexuelles afin de vérifier que les résultats obtenus sont dus à l'absence de ces hormones.

4. Nous étudierons *in vitro* la fonction des progéniteurs vasculaires en culture primaire qui auront été isolés à partir de vaisseaux de souris

Nous utiliserons au maximum 260 souris sur 5 ans.

Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

Remplacer: Dès que possible, les voies et les molécules impliquées seront étudiées *in vitro* sur des cellules en culture (progéniteurs en culture, cellules vasculaires en culture), cependant la régulation de la pression artérielle et la participation de cellules au remodelage vasculaire ne peuvent être évalués qu'*in vivo*, c'est pourquoi ce projet nécessite des modèles murins.

Réduire: Le nombre d'animaux par groupe a été établi avec notre expérience concernant ce type d'analyses et ces modèles murins pour être au minimum. De plus, nous prélèverons différents types de vaisseaux pour pouvoir étudier leur remodelage (aorte, vaisseaux mésentériques) mais aussi d'autres organes pour étudier leurs vaisseaux (cœur, rein, poumon) et pour extraire les ARN messagers (ARNm) et les protéines. A notre connaissance, ces expériences n'ont jamais été réalisées ni en France, ni dans le monde, par d'autres équipes dans un protocole expérimental semblable.

Raffiner: Les volumes injectés seront établis en accord avec le volume sanguin de l'animal afin d'injecter les plus petits volumes possibles. Les animaux sont pesés en début de procédure. Les animaux seront stabulés en groupe (2 à 6 souris par cage) en portoirs ventilés avec : -enrichissement de la sciure avec de la ouate, -enrichissement de l'environnement structurel et social favorisé par des activités physiques et cognitives (des jeux cartonnés), -accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. La température et l'hygrométrie sont contrôlées et monitorées. Le cycle d'éclairage est de 12h par jour (6h-18h). Une surveillance quotidienne sera effectuée par les zootechniciens et hebdomadaire par le porteur de projet pendant laquelle nous évaluerons les points limites : -lésion cutanée, -incapacité à se déplacer, -toiletage et -posture de l'animal. De manière globale, le comportement et l'aspect physique et expression faciale seront analysés. Si le comportement d'un animal est altéré, il sera pesé afin de détecter une éventuelle perte de poids (point limite à 20% de perte de poids). Dans le cas où un des points limites serait atteint, des procédures d'euthanasie appropriées afin de réduire la souffrance seront mises en place.

16649 Par sa capacité à excréter efficacement le sel (Na⁺ et Cl⁻), le rein contrôle le volume sanguin et donc la pression artérielle. Cette propriété du rein dépend de nombreux acteurs et nous avons récemment identifié une nouvelle voie qui permet aux cellules rénales dites intercalaires de type A (CIA) de sécréter du Na⁺ et du Cl⁻. Cette découverte représente à bien des égards une petite révolution puisque cette fonction de sécrétion n'avait jamais été décrite dans l'épithélium rénal et que les CIA n'avaient jamais été soupçonnés de jouer un rôle dans la balance sodée de l'organisme.

Cette capacité de réguler finement l'excrétion de sel est liée au fait que les cellules intercalaires de type A expriment à leur membrane apicale une protéine qui transporte les ions sodium, proton et potassium appelée H,K-ATPase de type 2 (HKA2). Dans ce projet, nous allons chercher à comprendre le rôle physiologique de cette nouvelle voie en étudiant la réponse des souris invalidées pour le gène *Atp12a* codant pour la sous-unité catalytique de la HKA2 à un régime hypersodé. De plus, les CIA sont connues pour proliférer sous l'effet d'un facteur de croissance, GDF15, et nous souhaitons déterminer si ce facteur est impliqué dans la réponse des cellules intercalaires au régime hypersodé. Ainsi, nous souhaitons caractériser cette nouvelle voie en étudiant l'adaptation physiologique d'animaux dépourvus

de HKA2 ou de GDF15 à un régime riche en sel afin de déterminer si ces deux protéines participent au maintien de la balance sodée et de la pression artérielle.

En fonction de la sensibilité des différentes approches expérimentales mises en oeuvre, des groupes de 12 souris mâles adultes (pour les études métaboliques, 49 groupes) et de 8 souris mâles adultes (pour les études cinétiques de l'expression de protéines et de gènes 45 groupes) soit un total de 948 souris seront nécessaires pour réaliser ce projet qui durera 4 ans. L'utilisation d'animaux est indispensable puisqu'il s'agit de questionner un processus physiologique complexe qui fait intervenir la nutrition, la fonction rénale, le volume et les paramètres extracellulaires et la pression artérielle. Quant à l'utilisation des souris, elle est indispensable car les animaux génétiquement modifiés existe déjà et permettront de répondre à la question de l'implication des gènes ATP12A et GDF15 dans l'adaptation à une charge en sel. De plus, les données concernant la physiologie rénale sont pléthores dans cette espèce. Afin de respecter les règles éthiques d'utilisation d'animaux à des fins expérimentales (3Rs), une attention particulière sera apportée à réduire leur nombre ainsi que leur stress. Ainsi, par exemple, la gestion de nos colonies de souris se fera le plus souvent possible par croisements « incross » afin de ne pas générer trop d'animaux hétérozygotes devant être sacrifiés. De plus, des protocoles thérapeutiques de prise en charge de la douleur et les critères d'interruption d'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien être des animaux au cours de l'étude. Enfin, cette étude est menée spécifiquement pour mesurer les effets physiologiques complexes faisant intervenir différents systèmes biologiques, l'utilisation animale ne peut donc pas être évitée. Par ailleurs, les données obtenues permettront d'alimenter un modèle informatique de fonctionnement du rein qui prendra en compte cette nouvelle voie physiologique et qui à terme permettra de tester des hypothèses *in silico*.

16650 Le foie est un organe vital qui intervient dans le stockage du glucose, la fabrication de la bile et la détoxification. L'incidence du cancer du foie (CHC) est en forte augmentation depuis 20 ans et ce cancer représente la 2ème cause de mort par cancer dans le monde. Ce cancer grave dispose de très peu de traitements efficaces et l'apport de nouvelles stratégies thérapeutiques représente donc un enjeu majeur dans la prise en charge de cette maladie. Bien que des progrès aient été accomplis dans le déchiffrement des mécanismes moléculaires du CHC, la dissection des événements précoces de la carcinogenèse hépatique, notamment comprendre la transformation tumorale des hépatocytes, est centrale pour comprendre la pathogénie sous-jacente de la maladie. 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, cellule majoritaire du foie.

Dans ce cadre, notre équipe s'intéresse notamment 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 : (1) régulateurs essentiels du cycle de division, tels que ATM/ATR et la voie cGAS-STING (contrôle des dommages à l'ADN) et la GTPase RhoA (contrôle de la mitose) (2) d'acteurs clés de la réponse immunitaire/inflammatoire (DNAM-1, LECT2), dans la physiopathologie hépatique. Pour répondre à cette problématique, nous utiliserons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées et le nombre de souris utilisées sera d'au maximum 680.

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 (chirurgie) sera précédée d'une anesthésie générale et l'animal recevra un analgésique avant et après la chirurgie. A

la fin de la chirurgie, si l'animal est gardé en vie pour les besoins de l'expérimentation, ce dernier recevra un suivi particulier heure par heure pendant les quatre premières après la chirurgie (période critique, risque d'hémorragie), puis toutes les 24 heures jusqu'à 72 heures post-chirurgie. Par ailleurs, de la nourriture et du gel à haute valeur nutritive seront fournis, ainsi que des moyens supplémentaires pour maintenir la température corporelle après la chirurgie. 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 ce projet nous permettront de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents à la prolifération des hépatocytes pour assurer l'intégrité génomique dans le foie, mécanismes faisant défaut au cours de l'hépatocarcinogenèse humaine. Ces travaux pourraient ainsi permettre le développement de nouveaux outils diagnostic/pronostic du développement du carcinome hépatocellulaire chez l'homme.

16651 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 cet objectif. Nous travaillons sur certaines chimiothérapies (anthracyclines ou oxaliplatine) capables d'activer le système immunitaire et générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. Une étude clinique rétrospective a mis en évidence qu'un polymorphisme affectant certains gènes, impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie, est associé avec une réduction de la survie chez des patients atteints de cancer du sein ou colorectal, recevant respectivement des anthracyclines ou de l'oxaliplatine. Le but de ce projet est de comprendre si des molécules, sélectionnés *in vitro*, combinés aux chimiothérapies immunogènes peuvent être un traitement compensatoire des effets provoqués par un défaut de la voie de signalisation des ces 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* et ne peut donc pas faire l'objet de remplacement par d'autres techniques. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris transgéniques (n. 870), 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. Nous préconisons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur la régulation de la réponse immunitaire aux cancers pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

16652 Le foie est un organe vital qui intervient dans le stockage du glucose, la fabrication de la bile et la détoxification. L'incidence du cancer du foie (CHC) est en forte augmentation depuis 20 ans et ce cancer représente la 2ème cause de mort par cancer dans le monde. Ce cancer grave dispose de très peu de traitements efficaces et l'apport de nouvelles stratégies thérapeutiques représente donc un enjeu majeur dans la prise en charge de cette maladie. Bien que des progrès aient été accomplis dans le déchiffrement des mécanismes moléculaires du CHC, la dissection des événements précoces de la carcinogenèse hépatique, notamment comprendre la transformation tumorale des hépatocytes, est centrale pour élucider la pathogénie sous-jacente de la maladie. 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, cellule majoritaire du foie.

Dans ce cadre, notre équipe s'intéresse notamment 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 : (1) régulateurs essentiels du cycle de division, tels que ATM/ATR et la voie cGAS-STING (contrôle des dommages à l'ADN) et la GTPase RhoA (contrôle de la mitose), (2) d'acteurs clés de la réponse immunitaire/inflammatoire (DNAM1, LECT2), dans les processus de carcinogenèse hépatique. Pour répondre à cette problématique, nous utiliserons plusieurs lignées de souris génétiquement modifiées et le nombre de souris utilisées sera d'au maximum 1760.

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. 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.

Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Les souris seront 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-Isofluorane [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 sera 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 ce projet nous permettront de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents à la prolifération des hépatocytes pour assurer l'intégrité génomique dans le foie, mécanismes faisant défaut au cours de l'hépatocarcinogenèse humaine. Ces travaux pourraient ainsi permettre le développement de nouveaux outils diagnostic/pronostic du développement du carcinome hépatocellulaire chez l'homme.

16653 La pandémie à coronavirus SARS-Cov2 apparue en Chine en décembre 2019 (COVID-19) a remis au premier plan le syndrome de détresse respiratoire (SDRA), une maladie aigüe où le poumon n'est plus fonctionnel et ne peut plus assurer l'oxygénation et la décarboxylation (élimination du gaz carbonique) du sang. Lorsque cette maladie est sévère, le patient doit être placé dans un coma artificiel et mis sous ventilation artificielle mécanique. La prise en charge consiste alors à réaliser une ventilation protectrice (programmes de ventilation spécifiques permettant d'optimiser la guérison et la cicatrisation pulmonaire), et lorsque la ventilation mécanique ne suffit plus, le recours à un poumon artificiel extra corporel, appelé ECMO veino-veineuse peut être utilisé pour prévenir du décès par hypoxie.

La prise en charge d'un SDRA consiste à optimiser la guérison du poumon tout en assurant une oxygénation du sang compatible avec la vie. On utilise pour cela un régime de ventilation qui protège le poumon, ou du moins qui vise à prévenir l'apparition de nouvelles lésions. Le mode de ventilation protectrice le plus utilisé consiste à insuffler de petits volumes (300-400ml) à une haute fréquence respiratoire (35/minute), en surveillant de ne pas induire des pressions intra thoraciques trop élevées qui pourraient léser le poumon. Très récemment, un nouveau mode ventilatoire a été développé, nommé TCAV (Time Control Adapted Ventilation) et semble prometteur. Son concept est d'augmenter la pression dans les voies aériennes pour maintenir constamment le poumon ouvert, et de limiter au maximum la mobilisation du tissu pulmonaire au cours du temps. L'une des principales limites à la

tolérance de ce mode ventilatoire est son potentiel retentissement hémodynamique. En effet, il existe des interactions cœur-poumon, et ventiler en pression positive peut conduire à une défaillance cardiaque.

De même, beaucoup d'études se sont intéressées à la question de comment ventiler un patient en arrêt cardiaque. Il en résulte des recommandations claires : ventilation en petits volumes (300ml), petites fréquences (10/min). En effet, bien qu'il soit nécessaire d'oxygéner le sang, ventiler avec de trop hautes pressions intra thoraciques pourrait altérer l'hémodynamique en s'opposant à la circulation du sang/retour veineux. Lorsque le poumon est en SDRA, il ne participe que très peu à l'oxygénation du sang. Lorsque le patient est connecté à un poumon artificiel (ECMO VV), l'intérêt de la ventilation mécanique semble discutable voire délétère. Aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à l'intérêt de la ventilation mécanique lors d'un arrêt cardiaque sous SDRA.

Ce projet comprend donc deux études distinctes :

Ø La première étude a pour objectif d'évaluer le retentissement hémodynamique d'un nouveau mode ventilatoire (TCAV) au cours du SDRA

Ø La dernière étude a pour objectif d'évaluer l'impact/l'intérêt de la ventilation mécanique au cours d'un arrêt cardiaque sur poumon artificiel en SDRA

Afin de réduire au maximum le nombre de cochons nécessaire à ces deux études, il a été décidé de constituer une méthodologie commune. Le modèle animal de cochon est utilisé pour sa similitude avérée, en termes d'anatomie cervicale et d'hémodynamique, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique. L'adaptation à l'environnement physiologique direct du larynx et du cœur nous conduit à réaliser cette étude sur un modèle animal où toutes les contraintes seront présentes (impossibilité de remplacement). Le choix d'un modèle sur gros animal s'impose pour pouvoir implanter un poumon artificiel en dérivation.

Réduction : Ce projet utilisera 12 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 2 projets différents sur le même modèle porcin de détresse respiratoire aigue (2 méthodes de ventilation assistées). Nous avons constitué un seul et même schéma expérimental.

De plus, ce modèle est déjà en place et maîtrisé dans notre structure.

Raffinement des méthodes : 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. Nous avons établi des points limites suffisamment précoces pour éviter toute souffrance à l'animal : la fréquence cardiaque, respiratoire et sa pression artérielle sont suivies en continu. Toute modification de ces paramètres (majoration de 10% de la fréquence cardiaque, de la tension artérielle et de la fréquence respiratoire) signale un réveil, une douleur ou un inconfort de l'animal et induirait alors un réajustement immédiatement des traitements anesthésiques. A la fin de l'étude, l'anesthésie sera poussée permettant ainsi une mise à mort de l'animal par injection de médicament sans reprise de conscience. Des prélèvements de tissus serviront aux analyses biologiques post-mortem.

16654 Les toxoplasmes, parasites de l'homme, sont produits pour être utilisés dans différents types de kits de diagnostic de la toxoplasmose par méthode sérologique. Ces kits sont considérés comme référents 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 de ces tests de diagnostic *in vitro* car aucun mode de production de ces toxoplasmes sur une source non animale n'a pu être validé.

Le protocole utilisé génère de la douleur dans les heures qui précèdent la récolte d'ascite. Ce protocole a donc pour but de chercher à diminuer cette douleur pour l'animal en lui injectant un analgésique avant l'apparition de la douleur.

La souris est le modèle le plus adapté pour cette production. 2500 souris (femelles) sont nécessaires pour réaliser ce projet correspondant à 3 lots d'essais.

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

16655 Depuis le début des années 2000, des pathologies dues à certaines souches d'*Enterococcus cecorum* sont observées chez le poulet de chair. Ces pathologies apparaissent le plus souvent sur des oiseaux d'environ 4 semaines et consistent en des arthrites et ostéomyélites, notamment au niveau des vertèbres thoraciques. Toutefois, *E. cecorum* est aussi une bactérie naturellement présente dans le tube digestif des poulets sains. Les souches isolées du tube digestif diffèrent le plus souvent des souches isolées de lésions, ces dernières se révélant plus pathogènes lors d'infections expérimentales ou d'inoculations à l'œuf embryonné.

Il existe différentes espèces d'entérocoques (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. cecorum*...), dont certaines espèces sont présentes dans le tube digestif des volailles et peuvent être pathogènes pour l'homme. De plus, les entérocoques sont des bactéries naturellement résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques. Présentes au niveau du tube digestif, les souches commensales d'*E. cecorum* sont exposées aux différents traitements antimicrobiens administrés aux oiseaux par voie orale. Ces traitements risquent donc de sélectionner des souches d'*E. cecorum* résistantes à de multiples familles d'antibiotiques ou de favoriser le transfert de gènes de résistance entre souches d'entérocoques (exemple d'*E. cecorum* vers *E. faecalis*). Cette sélection de souche d'entérocoques résistants à de nombreuses familles d'antibiotiques constitue un problème de santé publique.

Le projet vise à développer un modèle de colonisation digestive de poulets avec une souche d'*E. cecorum*, porteuse de gènes de résistance vis-à-vis d'antibiotiques critiques pour la santé humaine ou couramment utilisés en médecine vétérinaire, et de gènes de résistance vis-à-vis d'anticoccidiens (des anti-parasitaires fréquemment utilisés en production avicole). Le modèle développé permettra ensuite d'évaluer l'impact de l'utilisation de différents antibiotiques ou anti-coccidiens sur la sélection de souches d'*E. cecorum* ou d'autres entérocoques, résistants aux antibiotiques.

Les poulets utilisés seront de souche Leghorn EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés) de notre laboratoire. Cette saisine utilisera au total 120 poussins, répartis en huit lots de 15 poussins. Les lots seront inoculés ou non avec deux différentes doses d'*E. cecorum* et trois différents types de traitements antimicrobiens. Compte tenu des caractéristiques de la souche d'*E. cecorum* utilisée et de l'âge des oiseaux, il est peu probable que le modèle entraîne des symptômes ou lésions chez les oiseaux. Les inoculations et traitements se feront par voie orale. Des prélèvements de matières fécales seront collectés et analysés pour comparer l'excrétion de la souche résistante inoculée dans les différents lots, ainsi que la sélection d'autres souches d'entérocoques résistants aux antibiotiques.

Règle des 3R : les animaux seront hébergés en isolateurs et bénéficieront d'enrichissements appropriés (plateformes et éléments de perchage). Les inoculations aux poussins sont peu susceptibles de les rendre malades, car la souche d'*E. cecorum* utilisée a été caractérisée (séquençage complet du génome et tests *in vitro* et sur œufs embryonnés) et se révèle faiblement pathogène. Pour détecter une éventuelle souffrance des animaux, ils seront surveillés quotidiennement (4 à 5 passages par jour en cas d'apparition de symptômes) pour détecter des comportements anormaux (difficulté locomotrice par exemple). Toutes les précautions seront donc prises pour abréger une éventuelle souffrance. L'utilisation des animaux est indispensable pour ce projet. Cependant, le nombre d'animaux a été fixé au minimum acceptable pour atteindre les objectifs du projet.

16656 La relation entre voyage aérien de longue durée et risque de thrombose veineuse profonde est connu depuis près de 60 ans. Avec plus de 2 milliards de voyageurs par an dans le monde, le risque calculé de thrombose induite par les vols est de 1,1% et ce risque est augmenté de 12 % chez les patients faisant au moins un voyage annuel long courrier. Plusieurs facteurs pourraient intervenir dans la formation de la thrombose voire dans l'accident thrombo-embolique : l'immobilité durant un temps long, dans un contexte de déshydratation en relation avec le faible degré hygrométrique des cabines mais aussi les conditions de faible pression engendrant un état d'hypoxie. En effet, si les avions de ligne volent en moyenne à 10.000m d'altitude, la pressurisation de la cabine ramène les passagers à une altitude correspondant à 2000m au-dessus du niveau de la mer, ce qui entraîne tout de même une baisse de 20% de la pression partielle en oxygène. L'objectif du projet est d'étudier chez la souris l'influence de la pression, de l'hygrométrie, et de la pression partielle en oxygène sur la progression du thrombus expérimental.

Ce projet a été établi en respectant la règle des 3R. Ces études font suite à des expérimentations *in vitro* (sur cultures cellulaires) d'hypoxie et d'hypobarie au sein de notre équipe, dont les résultats ont encouragé la volonté d'expérimenter l'effet de différentes conditions d'oxygénation et/ou de pression sur des modèles animaux vivants, seul état par définition à refléter la réponse de l'organisme dans son ensemble à un traitement donné. La souris a été choisie car la formation de la thrombose n'est observable qu'*in vivo* et la physiologie de ce modèle est très proche de celle de l'homme et bien documentée dans la littérature.

Il n'existe à ce jour pas de méthode alternative ou complémentaire permettant d'observer la formation de thrombose veineuse profonde dans (Replace).

130 souris au total intégreront l'étude, ce nombre ayant été défini en s'appuyant sur des tests statistiques (Reduce). Après une semaine d'acclimatation et de sociabilisation (par des manipulations douces et répétées), les souris évolueront dans leur environnement habituel, soit une grande cage pourvue d'une litière de copeaux en couche épaisse permettant l'enfouissement de l'animal enrichie de plateformes en plastique. Nous placerons 6 souris par cage et les animaux auront accès à l'eau et à la nourriture ad libidum.

Pour reproduire les conditions d'oxygénation et de pression d'un vol long-courrier, les souris seront placées dans l'enceinte d'hypoxie, un caisson vitré permettant l'observation constante des animaux et pourvu des mêmes enrichissements que la cage habituelle. Afin d'observer la formation de la thrombose, les souris seront placées sous anesthésie gazeuse et sous analgésie. Une ligature partielle de la veine inférieure cave (90% de restriction du flux, modèle de Deep Vein Thrombosis) sera réalisée et les paramètres classiques hématologiques ainsi que les gaz du sang seront monitorés. A l'issue de la chirurgie, les souris seront replacées dans leur cage, en groupe, et des dispositions particulières seront prises (tel que l'ajout de petites bouillottes thermostatées pour lutter contre l'hypothermie pendant la phase de réveil). Les animaux seront observés en continu pendant l'étude et leur état sera évalué grâce à une grille de douleur adaptée (basée sur l'échelle de Morton et Griffith) (Refine). A la fin du protocole, les souris seront euthanasiées par dislocation cervicale après anesthésie gazeuse et les différents prélèvements biologiques seront recueillis pour analyses ultérieures.

16657 Les cellules immunitaires sont présentes dans presque tous les organismes pluricellulaires et leurs fonctions semblent être conservées des insectes aux mammifères. L'un des défis les plus difficiles consiste à identifier le programme permettant le développement et la spécification de ces cellules immunitaires. Chez la drosophile, nous étudions une protéine qui est essentielle pour la différenciation des cellules immunitaires semblables à celles des mammifères. Nous avons obtenu des réponses et compte tenu de la conservation des principaux processus biologiques au cours de l'évolution, nous prévoyons d'établir le rôle de cette protéine dans le développement et la fonction de ces cellules immunitaires chez les mammifères. Plus précisément, nous souhaitons explorer et identifier le rôle de cette protéine dans le système de régulation et la réponse du système immunitaire. Pour atteindre cet objectif, nous utilisons une souris dans laquelle cette protéine est absente dans les cellules immunitaires. Cette approche innovante ouvrira la voie à une étude du système immunitaire dont le dysfonctionnement est impliqué dans des maladies connues chez l'homme, par exemple la sclérose en plaque. L'ensemble du projet devrait nécessiter 48 souris, nombre incompressible du fait de la

nécessité de résultats statistiquement significatifs et de la prise en compte de l'ensemble des contrôles. 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 sont exécutées de façon à réduire l'inconfort des animaux : leur isolement a été limité à 24h pour éviter de les stresser. 3) Remplacement : les études sur des cellules en culture et sur la drosophile nous ont permis de répondre à certaines questions mais montrent leurs limites pour l'étude de systèmes biologiques aussi complexes que le système immunitaire des mammifères. Le rongeur est donc l'une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

16658 L'insuffisance mitrale (IM) est une des maladies les plus fréquentes parmi les pathologies des valves cardiaques chez l'Homme. Cette pathologie entraîne un défaut d'étanchéité de la valve induisant une insuffisance ventriculaire gauche chronique avec fatigue et gêne respiratoire, initialement à l'effort, puis pour des efforts de moins en moins importants.

10% des personnes de plus de 75 ans en France et Europe sont atteints par cette maladie. Cette prévalence est en constante augmentation du fait du vieillissement de la population mais également du fait du comportement à risque de certains sujets (alcool, stress, tabac). En 2015, on comptait dans le monde 22 millions de sujets souffrant de l'insuffisance mitrale, ce chiffre devrait atteindre 37 millions d'ici 2030 soit une hausse de plus de 65%. La pathologie peut aussi, plus rarement, également toucher des personnes jeunes.

Les formes légères d'IM sont souvent découvertes lors d'examens cardiaques par échographie. Les formes modérées peuvent être traitées par médicaments, les formes sévères nécessitent un examen approfondi, voire, dans certaines conditions, une opération chirurgicale. Malheureusement les sujets trop âgés ou trop fragiles ne sont pas éligibles à la chirurgie traditionnelle (ouverte) car trop invasive. Le taux de mortalité post opératoire est de l'ordre de 3 à 5%. Du fait de l'intervention invasive et des risques encourus, beaucoup de patients sont exclus d'une solution chirurgicale traditionnelle.

Face à ce constat, nous avons conçu un dispositif médical pour la réparation de l'insuffisance mitrale par voie transapicale et en chirurgie mini-invasive rendant accessible le traitement chirurgical pour tous les patients y compris les plus fragiles. Ce dispositif va apporter un bénéfice patients important puisqu'il va permettre de :

- réduire le temps d'intervention
- réduire les risques post opératoires (absence de circulation extra corporelle – sans sternotomie)
- meilleure convalescence du patient

Notre projet consiste à l'utilisation d'animaux vivants pour tester ce dispositif médical innovant. Cette phase animale est indispensable pour valider la mise en place et l'efficacité de ce dispositif, avant les premiers essais chez l'Homme. Pour ces travaux, nous utiliserons au maximum 8 ovins et 16 porcs sur 5 ans (minimum pour obtenir des résultats fiables). Ces espèces ont été choisies pour mener ces essais car leurs tailles et poids permettent un hébergement dans les meilleures conditions au sein de notre structure. De plus, la taille de leur cœur est stable et se rapproche le plus de celui de l'Homme, ce qui permet de travailler avec le même dispositif médical qui sera utilisé plus tard chez l'humain.

Toutes les compétences sont mises en œuvre pour limiter la souffrance des animaux. Ils sont hébergés dans le respect de leurs besoins éthologiques avec enrichissement du milieu. La chirurgie est réalisée par du personnel compétent pour ce type d'intervention et le suivi quotidien par des techniciens animaliers et des vétérinaires. De plus, des points limites suffisamment prédictifs sont définis permettant de sortir un animal de l'étude si la souffrance engendrée est trop importante.

16659 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 comme support de la régénération osseuse. Les capacités de régénération osseuse des matrices seront évaluées dans un modèle murin de défaut osseux au niveau du crâne selon deux modalités.

Modalité 1: matrice de collagène libérant de façon continue des facteurs d'ostéogénèse sous forme de complexes ARN.

Modalité 2: matrice de collagène encapsulant 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.

Deux types de matrices, trois types de formulation et trois types d'ARN seront évalués.

Des groupes de 5 souris sont prévus avec un lot de souris non traitées.

Les expériences seront répétées une fois, amenant à un nombre de 340 animaux.

Les dommages attendus pour les animaux sont modérés et sont à la fois liés à la trépanation pour créer le défaut osseux et à l'implantation de matrices de collagène dans la zone de défaut traumatique.

La trépanation peut entraîner, en cas de lésion vasculaire, un oedème cérébral et/ou une augmentation de la pression intracrânienne. C'est pourquoi nous suivrons les animaux avec une grille de scoring présentant des points limites prédictifs liés à la désorientation et aux signes de douleur.

Les animaux seront anesthésiés durant la procédure et recevront un analgésique en cas de douleur.

Les avantages liés à ce projet sont l'évaluation d'un nouveau substitut de greffe osseuse dans un modèle de régénération osseuse avec des applications en régénération osseuse maxillo-faciale chez l'Homme.

Nos travaux seront menés dans le respect de la règle des 3R.

Remplacement: ce projet est la suite de résultats obtenus sur des modèles in cellulo, le modèle animal est nécessaire à la validation des hypothèses.

Réduction: l'effectif des souris mis en oeuvre est limité au strict minimum permettant d'obtenir des résultats exploitables statistiquement Raffinement: les méthodes utilisées seront mises en oeuvre par du personnel formé (niveau chirurgie) et les points limites sont validés par le comité éthique local.

De plus, nous allons inclure une procédure d'imagerie non-invasive pour sélectionner la matrice qui sera évaluée pour la régénération osseuse.

Cette demande est un avenant à un projet autorisé, le projet 17594.

Nous avons déjà effectué des travaux in cellulo préalables aussi bien dans des modèles cellulaires monocouche que sur des matrices de collagène chargées avec des cellules pré-ostéoblastiques. Nous avons pu mettre en évidence que la transfection ARN induit bien l'ostéoinduction dans les MSCs dans ces deux modèles.

Les travaux chez le modèle animal sont dans la continuité de ces résultats.

16660 Les strongles digestifs (en particulier les cyathostomes qui sont majoritaires) sont actuellement les parasites les plus problématiques pour les équidés. Ils affectent la croissance des individus et sont susceptibles d'entraîner leur mort lors de l'émergence massive de stades larvaires enkystés dans la muqueuse caeco-colique. Le contrôle indispensable de ces parasites repose classiquement sur un emploi massif de vermifuge de synthèse. Toutefois, les rapports d'une efficacité diminuée de ces vermifuges abondent aujourd'hui à l'échelle mondiale et certains vermifuges ont des répercussions environnementales significatives. La recherche de solutions alternatives est donc nécessaire et l'efficacité de plantes bioactives, dont les métabolites secondaires ont montré des effets antiparasitaires chez les ruminants, commence à être évaluée sur les strongles des équins.

Cependant, de nombreux compléments alimentaires à base de plante (unique ou en mélange) sont déjà disponibles dans le commerce et proposés pour la gestion du parasitisme des équidés sur la base d'un usage traditionnel. Mais aucune donnée sur l'efficacité de ces spécialités contre les strongles équins n'est disponible.

L'objectif de notre essai est donc de tester si ces compléments alimentaires (n = 8) ont une efficacité avérée pour limiter l'excrétion d'œufs de strongles, et ainsi réduire la contamination des pâturages. Nos

tests se feront dans des conditions d'élevage sur des animaux infestés naturellement (n = 240) en fin de saison de pâturage. Les animaux les plus infestés (n = 60) seront mis en lot (n = 10) et recevront l'un des compléments alimentaires selon le mode d'administration préconisé. Leur niveau d'infestation sera mesuré après la cure pour déterminer l'efficacité du complément alimentaire.

Cette étude dispose donc d'un rapport bénéfice/coût favorable puisqu'elle ne nécessite qu'un nombre d'interventions limitées sur des animaux naturellement infestés, mais elle permet d'évaluer l'intérêt de produits commerciaux afin d'assurer le bien-être des animaux en élevage.

Remplacement : l'étude s'intéresse à l'efficacité de produits commerciaux qui ne peut pas être évaluée autrement que dans des conditions d'élevage car les tests en laboratoire sont actuellement peu prédictifs des effets chez l'animal.

Réduction : les lots sont constitués sur le nombre minimal d'animaux nécessaires pour détecter l'effet recherché, selon les recommandations de l'Association mondiale de parasitologie vétérinaire. Les produits testés sont sélectionnés sur la base de leur composition pour ne sélectionner que ceux à base de plantes les plus fréquemment utilisées.

Raffinement : L'étude est menée dans des conditions d'élevage et minimise le nombre de prélèvements sur les animaux (2 contrôles d'infestation). Elle s'apparente à une approche de vermifugation ciblée qui réclamerait le contrôle des individus les plus infestés, leur traitement et un contrôle d'efficacité. Par ailleurs, les animaux sont gérés par du personnel qualifié dans des installations appropriées pour la mise en œuvre des prélèvements requis.

16661 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. La viande de poulet est l'une des sources principales de contamination. En effet, cette bactérie infecte naturellement le poulet sans le rendre malade ; en France, 77% des élevages sont contaminés. 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. Certains candidats vaccins destinés aux poulets de chair ont été identifiés, mais aucune solution vaccinale n'est disponible sur le marché à ce jour.

Ce projet a pour objectif général de développer une stratégie de lutte vis-à-vis de la bactérie *Campylobacter jejuni* dans la filière avicole par la vaccination.

Il fait suite à un programme de recherche qui a mis en évidence deux candidats vaccins prometteurs contre la bactérie. Ces deux candidats vaccins prometteurs avaient permis de réduire drastiquement (plus de 3 log₁₀ UFC/g) la charge caecale en *Campylobacter* chez les poulets de chair lors d'un premier essai mais les résultats n'avaient pas été statistiquement confirmés lors d'un deuxième essai. Au cours de cet essai, un autre lot de vaccin avait été utilisé laissant supposer que les conditions de production des vaccins pouvaient impacter l'efficacité vaccinale (conformation protéique différente). Par ailleurs, une forte variabilité interindividuelle de la colonisation par *Campylobacter* (y compris chez les témoins non vaccinés) a rendu non significative la protection apportée.

Ces candidats vaccins doivent donc être testés à nouveau pour confirmer leur efficacité vaccinale contre *Campylobacter*. Au cours de ce projet, des lots de vaccins produits par une société spécialisée (de manière standardisée et contrôlée) seront évalués et comparés à un lot précédent. Des poulets de chair seront vaccinés puis inoculés par la bactérie pour estimer l'effet protecteur des candidats vaccins sur la charge caecale en *Campylobacter* jusqu'à 42 jours pour se rapprocher des conditions du terrain. En outre, pour mieux comprendre les réponses immunitaires du poulet en réponse aux vaccins en présence de *Campylobacter*, les réponses humorales spécifiques vis-à-vis des candidats vaccins, l'immunité muco-sale intestinale, l'immunité cellulaire et la composition du microbiote intestinal seront analysés.

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 (215 au total). 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 ou l'impact de la vaccination sur le microbiote n'est disponible. De plus, le vaccin a déjà été utilisé lors d'expérimentations précédentes chez les poulets de chair, et aucune réaction indésirable n'a été décelée suite à la vaccination. Par ailleurs, *Campylobacter* est considérée comme une bactérie commensale des poulets, et, à ce titre, l'infection est asymptomatique. Aucun effet indésirable n'est donc attendu au cours de cet essai.

16662 Le but du projet est de créer une nouvelle lignée de lapins, sélectionnée conjointement sur la survie des femelles, la santé et la croissance des lapereaux en appliquant une méthode d'optimisation de la sélection pour maximiser le progrès génétique et limiter l'évolution de la consanguinité. L'objectif du projet est de montrer qu'il est possible d'améliorer la survie des femelles et la résistance aux maladies sans compromettre la croissance des lapereaux. Les résultats de cette expérience ont vocation à être diffusés vers les sélectionneurs pour la sélection de lignées plus robustes et multi-performantes.

Pour réaliser la sélection génétique, 6300 animaux sont produits à chaque génération, ce qui représente un nombre total de 37800 animaux pour les 6 générations de l'expérimentation. On retient ensuite 168 femelles et 70 mâles pour constituer la nouvelle génération. Les femelles sont inséminées 8 fois, par insémination artificielle, à 42 jours d'intervalle avant d'être réformées. Cette durée de carrière est représentative de la durée moyenne de reproduction dans les élevages commerciaux. Pour avoir une estimation précise de la longévité des lapines, il est important d'avoir une durée d'étude la plus longue possible. En élevage cunicole, le nombre moyen de gestations, avec des intervalles de 42 jours, est égal à 8. Les seuls animaux faisant l'objet d'une procédure expérimentale (biopsie d'oreille réalisée à l'aide d'une pince Allflex) sont les reproducteurs mâles et femelles de chaque génération, soit 168 femelles et 70 mâles par génération, soit 1428 animaux au total pour les 5 années d'expérimentation.

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire pour 5 années de sélection est de 37800.

Parmi ces animaux, 1008 femelles et 420 mâles seront gardés. Les autres suivront le circuit classique de commercialisation.

Ce nombre d'animaux a été réfléchi de façon à :

- obtenir une évolution de consanguinité au plus égale à 1 % par génération, en fixant cette valeur d'évolution dans le calcul du choix des reproducteurs
- faire reproduire 8 fois les femelles à chaque génération
- obtenir un niveau d'intensité de sélection de 1,58 équivalent à celui d'une population commerciale

Remplacement : Ce programme de sélection génétique est un projet de recherche à objectif finalisé, c'est-à-dire que les connaissances acquises lors de ces travaux seront transmises et utilisées par les sélectionneurs cunicoles. C'est pourquoi nous avons recours à des animaux et que nos conditions expérimentales sont proches de celles des élevages conventionnels de manière à pouvoir transposer au mieux les résultats par la suite.

Raffinement : Les 37800 animaux nés de cette expérimentation seront élevés dans des cages collectives. Ces cages sont équipées de blocs de bois afin que les animaux puissent les ronger et jouer avec. Durant cette phase, aucun prélèvement ne sera fait sur les animaux, ils seront simplement nourris et surveillés. Les animaux seront pesés à 31 et à 63 jours afin d'effectuer la sélection des futurs reproducteurs. Les animaux sont sélectionnés à la fin de leur contrôle, selon leur valeur génétique, estimée à partir de leur performance de poids, de santé et les performances de longévité de leur mère et de leurs apparentés.

Les 168 femelles et 70 mâles par génération seront élevés dans des cages individuelles correspondantes aux normes d'élevage afin de :

- se rapprocher le plus possible de ce que l'on trouve sur le terrain et donc de pouvoir transposer nos résultats de recherche
- permettre aux femelles de s'occuper tranquillement de leurs portées sans avoir à la protéger des attaques des autres femelles lorsque celle-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 mâles sont visités tous les jours par les animaliers. Ils ont à disposition un morceau de bois à ronger dans leur cage pour contribuer à l'enrichissement du milieu et ont un contact visuel avec leurs congénères.

Les reproducteurs auront une double biopsie à une oreille lors de la mise en place en tant que reproducteurs. 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. Le matériel utilisé (pince + tube de prélèvement) est commercialisé par la société Allflex.

• Tous les animaliers possèdent l'habilitation de niveau 2 pour manipuler et entretenir les animaux. Une formation continue est assurée pour tous les animaliers lors de séminaires et de formations multi-espèces, et lorsque c'est possible sur le lapin, tout au long de l'année.

16663 Depuis plusieurs années, l'étude du développement du comportement animal met en lumière l'importance des facteurs épigénétiques véhiculés en particulier par la mère et son comportement maternel. Ces travaux initiés chez les Mammifères (primates, rongeurs) ont stimulé des recherches similaires chez les Oiseaux depuis une décennie. L'étude du comportement maternel et sa variabilité individuelle a montré clairement la transmission non génétique des traits comportementaux (comme l'émotivité ou la socialité) à la descendance chez les gallinacés. De plus, il a été démontré l'existence de style de maternage chez la caille, pour la première fois chez l'oiseau, les styles maternels étant définis comme des traits de personnalité stables chez un individu dans un contexte précis. Ces travaux ouvrent un large champ des possibles pour rechercher les mécanismes internes sous-jacents de la transmission des comportements chez l'oiseau. Cependant, à l'heure actuelle, les bases neurobiologiques du comportement maternel sont elles-mêmes peu connues chez l'oiseau alors que bien décrites chez les mammifères.

Nous proposons donc ici de réaliser une expérience visant à explorer les zones du cerveau activées lors du soin maternel chez un modèle oiseau, la caille japonaise, dont nous maîtrisons l'induction du comportement maternel. Nous comparerons le comportement et l'activité du cerveau de femelles maternelles (lot M, n=25) à des femelles non maternelles (lot NM, n=20). Chaque femelle maternelle adoptera 4 cailleteaux qui par leurs contacts tactiles et vocaux stimuleront le comportement maternel. Nous rechercherons les zones du cerveau activées en quantifiant l'activité des gènes à expression précoce suite à l'exposition des femelles maternelles ou non maternelles à des cailleteaux, et comparées à des femelles des deux lots qui n'auront pas été exposées à des cailleteaux.

Cette procédure implique l'utilisation de 145 oiseaux domestiques, 45 femelles adultes, et 100 cailleteaux. Cette procédure a été élaborée en adéquation avec la règle des 3R :

- Remplacement : Nous cherchons les bases cérébrales d'un comportement animal, nous ne pouvons pas avoir recours à des méthodes alternatives d'analyse *in vitro* ou *in silico*.

- Réduction : le nombre d'oiseaux prévu tient compte de la forte variabilité comportementale interindividuelle qui est observée chez l'animal, afin d'avoir des analyses statistiquement valides. L'effet des lots est initialement déséquilibré pour les femelles maternelles car nous attendons plus de variabilité pour ce lot que pour les contrôles. De plus, afin de s'assurer d'une bonne stimulation du comportement maternel, un effectif de 4 cailleteaux est nécessaire. Cet effectif de couvée est en dessous de la taille de couvée chez la souche variant généralement de 7 à 12 petits.

- Raffinement : les oiseaux sont élevés et maintenus dans des conditions adaptées à leur âge : en groupe au jeune âge et en cage individuelle à l'âge adulte. Les animaux en cage individuelle peuvent toujours avoir des contacts auditifs avec des congénères, les oiseaux utilisant principalement la communication vocale pour le contact social. Lorsque le sol est grillagé, une zone de repos est aménagée avec un tapis de sol.

16664 Les travaux pratiques de la Licence 3ème année de Sciences Pour la Santé de l'unité d'enseignement "physiologie" (et de l'élément constitutif "physiologie humaine") visent à former les étudiants, futurs professionnels de laboratoire, aux pratiques de la biologie intégrative, les sensibiliser au bien-être

animal et à l'éthique dans l'utilisation des animaux. Cette formation porte sur les paramètres déterminant la pression artérielle et la régulation nerveuse et hormonale du système cardiovasculaire. L'objectif principal des manipulations proposées, classiquement utilisées en laboratoire de recherche, est de former les étudiants aux pratiques expérimentales *in vivo*. Ils doivent notamment comprendre comment les manipulations effectuées, avec les outils et le protocole utilisés, permettent de répondre à un objectif scientifique.

Au delà de ces aspects disciplinaires, ces TP visent à l'acquisition de gestes techniques usuels d'expérimentation sur un modèle de laboratoire fréquemment utilisé en recherche, le rat.

Enfin, les objectifs pédagogiques intègrent pleinement l'aspect éthique de l'expérimentation sur des animaux. Lors des enseignements théoriques, les étudiants reçoivent un enseignement sur l'expérimentation animale, la règle des 3 R, et les demandes d'autorisation. Ainsi, les étudiants sont-ils vigilants au bien-être animal, à la prise en charge de l'anesthésie et de la douleur au cours de l'expérimentation.

Le design expérimental des séances respecte la règle des 3R :

-Réduction : pour réduire le nombre d'animaux, les étudiants travaillent en binôme. Vingt rats réformés par an au maximum sont utilisés (selon l'effectif des étudiants), soit 100 rats pour la durée de l'autorisation demandée. Afin d'améliorer l'encadrement de nos étudiants, et la gestion des animaux, ces TP sont organisés, en deux, trois ou quatre séances, chaque séance concernant 3 à 4 rats. De plus, cette demande ne concerne qu'une séance de TP, alors que la précédente demande en mentionnait deux. Dans le but de réduire le nombre d'animaux, les TP sur animaux ont été réduits par deux.

-Remplacement : le rat est un animal modèle adapté (taille pour les manipulations faites, paramètres étudiés proches de ceux de l'homme).

-Raffinement : les animaux sont commandés une semaine avant l'expérimentation. Ils sont gardés au sein d'une animalerie moderne, adaptée et agréée, en armoires ventilées. Le bien-être animal est pris en compte par des personnels compétents, de l'arrivée des animaux jusqu'à leur euthanasie (enrichissement des cages (tunnel, nid à usage unique), changements et nettoyages des cages, espaces aux normes adaptées). Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée par des personnels compétents et expérimentés. Les étudiants sont aussi formés puis encadrés lors des manipulations par des personnels compétents et spécialistes des pratiques concernées. Les animaux bénéficient d'une anesthésie générale et d'une analgésie tout au long de la séance de TP et Les travaux pratiques de la Licence 3ème année de Sciences Pour la Santé de l'unité d'enseignement "physiologie" (et de l'élément constitutif "physiologie humaine") visent à former les étudiants, futurs professionnels de laboratoire, aux pratiques de la biologie intégrative, les sensibiliser au bien-être animal et à l'éthique dans l'utilisation des animaux. Cette formation porte sur les paramètres déterminant la pression artérielle et la régulation nerveuse et hormonale du système cardiovasculaire.

L'objectif principal des manipulations proposées, classiquement utilisées en laboratoire de recherche, est de former les étudiants aux pratiques expérimentales *in vivo*. Ils doivent notamment comprendre comment les manipulations effectuées, avec les outils et le protocole utilisés, permettent de répondre à un objectif scientifique.

Au-delà de ces aspects disciplinaires, ces TP visent à l'acquisition de gestes techniques usuels d'expérimentation sur un modèle de laboratoire fréquemment utilisé en recherche, le rat.

Enfin, les objectifs pédagogiques intègrent pleinement l'aspect éthique de l'expérimentation sur des animaux. Lors des enseignements théoriques, les étudiants reçoivent un enseignement sur l'expérimentation animale, la règle des 3 R, et les demandes d'autorisation. Ainsi, les étudiants sont-ils vigilants au bien-être animal, à la prise en charge de l'anesthésie et de la douleur au cours de l'expérimentation.

Le design expérimental des séances respecte la règle des 3R :

-Réduction : pour réduire le nombre d'animaux, les étudiants travaillent en binôme. Vingt rats réformés par an au maximum sont utilisés (selon l'effectif des étudiants), soit 100 rats pour la durée de l'autorisation demandée. Afin d'améliorer l'encadrement de nos étudiants, et la gestion des animaux,

ces TP sont organisés, en deux, trois ou quatre séances, chaque séance concernant 3 à 4 rats. De plus, cette demande ne concerne qu'une séance de TP, alors que la précédente demande en mentionnait deux. Dans le but de réduire le nombre d'animaux, les TP sur animaux ont été réduits par deux.

-Remplacement : le rat est un animal modèle adapté (taille pour les manipulations faites, paramètres étudiés proches de ceux de l'homme).

-Raffinement : les animaux sont commandés une semaine avant l'expérimentation. Ils sont gardés au sein d'une animalerie moderne, adaptée et agréée, en armoires ventilées. Le bien-être animal est pris en compte par des personnels compétents, de l'arrivée des animaux jusqu'à leur euthanasie (enrichissement des cages (tunnel, nid à usage unique), changements et nettoyages des cages, espaces aux normes adaptées). Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée par des personnels compétents et expérimentés. Les étudiants sont aussi formés puis encadrés lors des manipulations par des personnels compétents et spécialistes des pratiques concernées. Les animaux bénéficient d'une anesthésie générale et d'une analgésie tout au long de la séance de TP (administration par voie ip de Zolétil (40 mg/kg) et par voie im de Domitor (0,35 ml/kg)), et sont placés sur un tapis chauffant.

16665 Le cancer du poumon est un des cancers les plus répandus dans le monde avec environ 2 millions de nouveaux cas diagnostiqués chaque année. C'est la cause la plus répandue de décès dû au cancer en France et dans le monde, car responsable de presque un décès sur cinq. Parmi l'ensemble des sous-types de cancer du poumon, l'adénocarcinome est la forme la plus courante et est malheureusement une maladie dévastatrice par sa haute prévalence et son mauvais pronostic. Le traitement de ce type de cancer représente donc un enjeu majeur de santé publique. De plus, l'augmentation de l'incidence du cancer du poumon au cours de la vie est liée à l'augmentation avec l'âge du risque intrinsèque de développer un cancer et au vieillissement de la population.

Notre laboratoire étudie le rôle important d'une oncoprotéine qui est souvent mutée et dérégulée dans 30% des cancers humains et qui est particulièrement importante dans l'adénocarcinome pulmonaire car elle se trouve en aval de presque tous les oncogènes de ces tumeurs.

L'objectif de notre étude est d'identifier les facteurs biologiques nécessaires à la formation des tumeurs pulmonaires chez les personnes âgées. Pour ce but, nous utilisons le modèle de l'adénocarcinome pulmonaire induit par un produit carcinogène, reproduisant l'effet du tabagisme.

À ce jour, aucune méthode alternative ne permet de récapituler fidèlement le vieillissement du tissu vivant et l'utilisation d'animaux de laboratoire (souris) reste nécessaire pour étudier les caractéristiques biologiques du développement de cancer bronchique dépendant de cette oncoprotéine chez les personnes âgées.

Afin de mener à bien cette étude, nous demandons 100 animaux au total.

Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos études dans le but de restreindre le nombre d'animaux grâce à des tests statistiques. Le modèle animal est essentiel dans notre étude car aucune modèle cellulaire ou tissulaire ne permettent d'étudier la formation des tumeurs pulmonaires chez les personnes âgées. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être des animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Ils seront hébergés par fratrie et à raison de 5 souris par cage. Chaque cage sera dotée d'un enrichissement du milieu, comme des nids, afin de réduire le stress des animaux. Un suivi des animaux sera réalisé en étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et l'équipe de recherche pour pouvoir agir rapidement et ainsi éviter tout inconfort ou souffrance des animaux. Les signes cliniques et des signes de maladie, accompagnés de grille d'évaluation, seront appliqués pour la détermination des points limites, réduisant leur douleur et souffrance.

16666 Dans les sociétés industrialisées, les problèmes de fertilité humaine sont de plus en plus fréquents. Pour pallier à ce véritable problème sociétal, la médecine moderne dispose de traitements hormonaux qui stimulent l'ovulation chez la femme. Au cours du traitement, les patientes reçoivent des doses massives d'hormones. Certaines d'entre elles sont réfractaires et doivent subir plusieurs traitements successifs permettant de définir pour chacune d'elle « au cas par cas » le dosage approprié capable

d'induire une bonne maturation folliculaire. L'autre point délicat du traitement est l'étroitesse du champ d'action entre une bonne stimulation ovarienne et un risque d'hyperstimulation. Nous développons une solution alternative aux traitements hormonaux d'induction de l'ovulation chez la femme qui apporte une meilleure efficacité. Le but de cette étude est de tester un nouveau traitement d'induction de l'ovulation chez le primate non-humain le singe *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*), modèle proche de la femme. Pour cela, 12 animaux naïfs seront inclus dans le protocole, à raison de 3 animaux par lot. Six (6) animaux supplémentaires sont inclus pour pouvoir pallier à une baisse de l'effectif des animaux à rentrer dans une expérimentation due à une absence de règles, à une mauvaise réaction aux anesthésiques ou une suite opératoire précédente difficile. Le nombre d'animaux est faible pour des raisons éthiques, mais sera suffisant pour observer les effets souhaités. Le nouveau traitement sera comparé aux traitements d'induction de l'ovulation classiquement utilisés chez la femme. Ce travail ne peut être fait sur un modèle cellulaire ou *ex vivo* car aucun modèle de ce genre n'est actuellement disponible pour l'étude de la fonction de reproduction. De même aucun autre modèle animal ne peut être utilisé car le traitement est destiné à être utilisé chez la femme : le singe *Cynomolgus* est l'espèce réglementaire pour ce genre d'étude. Nous avons limité le nombre d'animaux (3 animaux par lot) et raffiné nos procédures (prise de sang sous anesthésie, procédure d'imagerie non invasive). Le système d'élevage ne sera pas modifié et il y aura un enrichissement social (hébergement en groupe, surface suffisante par animal, présence de jouets).

16667 L'hépatite alcoolique (ASH) et non alcoolique (NASH) sont deux maladies chroniques du foie avec des étiologies distinctes, la consommation chronique d'alcool et la lipotoxicité, respectivement.

Ces deux maladies partagent cependant des lésions histologiques similaires et des mécanismes physiopathologiques. C'est une agression chronique venant interférer avec l'homéostasie lipidique, qui conduit à un dysfonctionnement des organites, tel que le réticulum endoplasmique ou les mitochondries. Ce dysfonctionnement va aboutir à un stress et à la mort cellulaire. Ce stress incite secondairement des processus inflammatoires. Les conséquences sont alors l'apparition de lésions hépatiques de fibrose, qui peuvent aller à la cirrhose ou de carcinome hépatocellulaire. A l'heure actuelle aucun traitement pharmacologique sûr, n'est à disposition pour l'une ou l'autre des maladies. Plusieurs agents thérapeutiques ont été testés dans la NASH avec plus ou moins de réussite et le développement de nouvelles modalités thérapeutiques est un domaine de recherche très important. A l'inverse, les thérapies visant l'ASH apparaissent très limitées et ne font l'objet de très peu de recherche. Dans ce contexte, du fait, de mécanisme commun donc de cibles thérapeutiques identiques, il serait potentiellement possible d'avoir une efficacité médicamenteuse d'un même traitement pour les deux pathologies.

Une des molécules en cours d'évaluation dans la NASH est l'acide Obéticholique (OCA), agoniste des récepteurs FXR également impliqué dans L'ALD.

Chez l'animal l'OCA a montré un effet bénéfique sur la lipogenèse et la stéatose et semble apporter un effet comparable sur les lésions de NASH chez l'homme. (Etude Regenerate en cours). L'OCA est donc susceptible de devenir une option de traitement. Cependant dans le cadre des ALD, aucune étude n'a été déclarée chez l'homme. Une seule étude chez l'animal a montré des effets bénéfiques sur un stade précoce de la maladie et dans une stratégie de traitement préventive et non curatif. Par ailleurs, il est reconnu que le microbiote intestinal participe au développement de ces pathologies. Ainsi de récents résultats ont montrés le rôle des Microvesicules extracellulaires (MVs) de patient NASH dans la perméabilité intestinale. Ces MVs sont issues des bactéries intestinales et pourraient jouer un rôle dans le développement de l'ASH dans lequel la perméabilité intestinale est également présente.

Nous nous proposons donc d'évaluer les effets de l'OCA et le rôle des MVs, dans un modèle d'ALD avancé chez la souris. Il n'existe pas de méthode alternative au développement de lésions hépatiques impliquant l'ensemble des acteurs cellulaires et structurels pour la pathologie de stéatose hépatique alcoolique. Le modèle *In vivo* nous permettra d'évaluer l'interaction entre le microbiote, et les lésions de hépatiques. D'où l'utilisation d'un modèle animal. Le modèle utilisé sera le National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism model « NIAA ». Il représente à l'heure actuelle le modèle le plus accessible et le plus reproductible des lésions hépatiques observées au cours de l'ASH. Nous souhaiterions développer des lésions hépatiques caractéristiques de stade avancé de la pathologie

avant de débiter le traitement à l'OCA. Il nous faut donc évaluer dans un premier temps les modalités expérimentales optimales de modélisation, répondant à nos besoins. Puis nous évaluerons les effets de l'OCA dans ce modèle selon une stratégie thérapeutique de traitement de la maladie après son développement.

Pendant toute la durée expérimentale, nous veillerons à respecter la règle des 3R. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins utilisés sont les plus appropriées pour 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 sera évaluée par la réalisation d'un score clinique. Une grille présentant les points limites (Annexe) sera utilisée pour déterminer la conduite à tenir. L'apparition de douleur ou d'atteinte de l'intégrité physique de l'animal engendra une prise en charge de la douleur (anesthésiants, analgésique), des soins ou une sortie de l'animal de l'expérimentation. La mortalité liée à l'ingestion d'alcool est estimée à 25%. Un nombre de souris supplémentaire (25%) sera prévu en remplacement des décès dus à la modélisation avec alcool. Afin de répondre à l'utilisation d'une analyse multi variée des paramètres observés, nous avons établis à un nombre total de 204 souris pour l'évaluation du modèle d'ALD et l'évaluation de l'OCA. Cette technique nous permettra d'augmenter les connaissances mécanistiques de l'ALD et d'améliorer les possibilités thérapeutiques chez l'homme.

16668 Les malformations cardiaques représentent l'une des causes les plus fréquentes de mort chez le nouveau-né. Le pôle artériel (appelé région conotruncale chez l'homme) est la région du cœur la plus souvent affectée dans les cardiopathies congénitales (>30%). Ces malformations, qui affectent préférentiellement une région particulière du cœur, suggèrent un défaut dans une sous-population particulière de progéniteurs cardiaques. L'identification des mécanismes de spécification, de migration et de différenciation des progéniteurs cardiaques, en particulier dans certaines sous-populations, est cruciale pour mieux comprendre l'étiologie des malformations cardiaques congénitales. De plus, sur le long terme, corriger les malformations congénitales par thérapie cellulaire nécessitera de programmer les progéniteurs vers un lignage cardiaque spécifique. Il apparaît donc nécessaire de connaître les processus moléculaires de cette spécification.

Nous utilisons des modèles murins pour étudier le développement précoce du cœur. Afin de réduire le nombre de femelles gestantes utilisées pour nos études, nous utiliserons un protocole de super ovulation qui permet d'avoir un plus grand nombre d'embryons par portée. Sur deux ans, cent jeunes femelles, âgées de 3 à 6 semaines, entreront dans la procédure et recevront une injection intrapéritonéale de gonadotropine chorionique équine (PMSG ou eCG) puis 48 h après une injection de gonadotropine chorionique humaine (hCG). Elles seront ensuite mises en croisement. L'accouplement sera détecté par l'observation non invasive de la présence d'un bouchon vaginal chez la femelle. La femelle sera mise à mort pour prélever les embryons au stade développemental souhaité.

Cette étude sera réalisée 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). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par groupe de 3 à 5 animaux dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton ou de papier kraft. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter des signes souffrance liés à l'injection. L'apparition de signes cliniques conduira à la mise à mort immédiate de l'animal concerné.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- Remplacer : une partie de l'étude du développement cardiaque précoce sera réalisée par des analyses *in vitro* (cellules souches embryonnaires, gastruloïdes) mais tous les mécanismes influençant le développement ne peuvent être modélisés en culture (flux sanguin, interactions paracrines...). L'état actuel des connaissances ne permet pas de se passer des études *in vivo* sur le sujet.
- Réduire : l'objectif de ce projet est de mettre en place un protocole médicamenteux permettant d'obtenir un nombre conséquent d'embryon à partir d'un nombre réduit de souris adultes.

- Raffiner : afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Les animaux seront observés quotidiennement suite aux injections. L'apparition de signes de souffrance conduira à la mise à mort de l'animal.

16669 Malgré des progrès remarquables en matière de prévention et de traitement, le cancer reste une cause majeure de mortalité dans le monde. Depuis quelques années, notre groupe est spécialisé dans le développement de stratégies de chimiothérapies sélectives ciblant les cellules tumorales. Les vecteurs anticancéreux que nous développons véhiculent un médicament vers la tumeur sous une forme non-toxique. Au niveau de la tumeur, le vecteur anticancéreux est reconnu par une enzyme présente dans le microenvironnement tumoral de très nombreuses tumeurs, la beta glucuronidase. Cette interaction entre l'enzyme et le vecteur déclenche une succession de réarrangements dans ce dernier qui conduit à la libération du médicament sous sa forme active. Dans ce contexte, le projet pluridisciplinaire déposé ici a pour objectif de développer un concept analytique original, non invasif et indolore permettant le diagnostic ultra-précoce de l'ensemble des cancers solides. Inspiré de la stratégie de chimiothérapie sélective que nous avons développée, ce projet repose sur l'administration aux animaux d'une molécule qui sera décomposée au niveau de la tumeur par la beta glucuronidase pour libérer du CO₂ lourd qui pourra alors être détecté dans l'air expiré par les animaux portant des tumeurs.

Pour mener à bien cette étude, nous réaliserons une seule procédure expérimentale pour un total de 80 souris. La stratégie a déjà été validée *in vitro*. Afin de connaître le potentiel de cette stratégie, il est à présent obligatoire de transposer ce concept sur des modèles animaux. Afin de réduire le stress des animaux généré par les expérimentations, ces dernières seront réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Une grille d'évaluation des signes cliniques sera réalisée pour chaque individu de l'étude afin de suivre le plus précisément possible l'évolution de son état de santé. Afin de pouvoir étudier notre stratégie analytique chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro* (remplacer). Comme mentionné plus haut, la stratégie de ciblage des tumeurs a déjà été validée par notre laboratoire lors d'études préliminaires. Les données recueillies lors de nos précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. La « Règle des 3R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées (groupe de 5 souris, nid, jouets, etc) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). Dans l'hypothèse d'apparitions de signes de douleurs, un traitement à base de buprénorphine sera mis en place.

16670 La méningite est une inflammation de la membrane enveloppant le cerveau, les méninges. Une proportion importante des méningites est d'origine bactérienne et l'organisme responsable de cette infection est le plus souvent *Neisseria meningitidis* (Meningocoques) dont il existe plusieurs sérogroupes (A, B, C, W135, X, Y...). La méningite est une pathologie grave qu'il est important de diagnostiquer rapidement afin de mettre en place au plus tôt le traitement approprié.

La technique conventionnelle pour l'identification est la culture. Cette technique qui, est essentielle pour la confirmation du diagnostic et la détermination de l'antibiogramme, est lente et peut conduire, si l'échantillon a été transporté et conservé dans des conditions inadaptées, à des résultats faussement négatifs.

Les techniques immunologiques de détection dans les fluides biologiques (LCR, sérum...) d'antigènes provenant des organismes infectieux permettent un diagnostic beaucoup plus rapide.

C'est pour ces raisons que nous souhaitons développer un test immuno-chromatographique permettant la détection des Méningocoques dans le liquide céphalo rachidien (LCR). Ce test, basé sur la réaction anticorps-antigène, nécessite de disposer d'anticorps très sensibles. De tels anticorps ne sont pas commercialement disponibles.

De nombreux essais d'immunisation réalisés pour l'obtention d'anticorps monoclonaux n'ont pas permis d'obtenir des anticorps répondant à nos besoins, pour cette raison, les anticorps polyclonaux

représentent une solution alternative. De plus les anticorps polyclonaux sont connus et utilisés pour apporter une sensibilité faisant parfois défaut aux anticorps monoclonaux.

C'est dans ce contexte que nous soumettons ce protocole pour approbation. Ce protocole conduira à l'obtention d'un immunosérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. Le choix des animaux, le nombre d'animaux par série, les immunogènes et le protocole ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible.

Il est prévu pour notre projet d'immuniser plusieurs séries de 3 ou 5 lapins. Le nombre total de lapins immunisés pour développer des anticorps contre les différents sérogroupes sera au maximum de 40 lapins sur 5 ans.

Ces animaux permettront de constituer un stock d'anticorps couvrant de nombreuses années de production, les antisérums étant considérés comme stock patrimoine dans notre société, c'est à dire sans date d'expiration.

16671 Le Virus Respiratoire Syncytial (RSV) est un agent causal majeur d'infections respiratoires. Ce virus provoque des épidémies automno-hivernales et est extrêmement contagieux : il infecte 70% des enfants dès leur première année de vie et 100% des enfants lors de leurs 2 premières années. Le RSV cause également des réinfections tout au long de la vie, à un taux de 5 à 10% par an. Il est le principal responsable des bronchiolites du nourrisson et est responsable chaque année de 33 millions d'infection respiratoires basses, 3.2 millions d'hospitalisations et 100 000 morts parmi les enfants de moins de 5 ans. Chez les personnes âgées et fragilisées, il est aussi la cause d'une morbidité et d'une mortalité importante : il est retrouvé chez 6 à 10% des patients de plus de 65 ans hospitalisés pour pathologies respiratoires, avec une mortalité associée de 8 à 10%.

Malgré le poids énorme en santé publique des infections par le RSV, il n'existe à ce jour aucun vaccin ni aucun traitement contre ce virus. Il est donc essentiel de développer des candidats vaccins et des antiviraux afin de pallier ce manque.

Ce projet vise à développer un candidat vaccin contre le RSV. Ce candidat vaccin a déjà montré son efficacité dans un modèle murin et sera ici évalué chez le primate non-humain. En effet, 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 au RSV dans un contexte physiologique proche de l'être humain. Le candidat vaccin sera administré aux macaques et nous évaluerons son innocuité ainsi que la réponse immunitaire qu'il induit. Les animaux seront ensuite exposés au virus RSV afin de tester l'efficacité du vaccin à les protéger contre ce virus. Nous caractériserons également les mécanismes immunitaires impliqués dans la protection.

Au maximum, 58 animaux nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés seront inclus dans ce projet d'une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit 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, vaccinations et expositions au pathogène réalisées sous anesthésie générale). Des critères d'arrêt sont prévus en cas d'éventuels effets inattendus du vaccin ou de progression de la maladie. Les vétérinaires de l'installation seront alertés et mettront en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en groupe lors de la phase de vaccination et transitoirement dans des modules individuels contigus permettant des interactions sociales, visuelles, auditives et olfactives lors de l'infection. Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie.

16672 Une surveillance active des affections virales des poissons au niveau du territoire national est indispensable afin de détecter rapidement l'apparition de maladies réglementées, d'anticiper les émergences de nouveaux pathogènes ou encore les évolutions de virulence de pathogènes connus.

Si les projets collaboratifs menés dans un contexte de recherche peuvent donner lieu à des dossiers d'autorisation clairs et précis, cela est plus difficile dans le cadre d'épisodes infectieux survenant brutalement en élevages piscicoles ou dans le milieu naturel. La rapidité de réaction est, dans ces cas, cruciale et impose, notamment dans des contextes inhabituels où un nouveau pathogène ou une forme variante d'un pathogène connu est suspecté, de réaliser de manière très réactive des tests et expérimentations sur des poissons issus de l'élevage touché. La diversité des cas observés sur le terrain et l'adaptation nécessaire des réponses à apporter nécessitent de disposer d'une autorisation d'expérimentation spécifique relativement souple couvrant les analyses et recherches complémentaires nécessaires pour réagir, comprendre et proposer rapidement des moyens de prévention et de contrôle.

Cette saisine s'inscrit dans ce contexte. Elle vise à englober l'ensemble des expérimentations à mettre en place sur les poissons d'un élevage ou de la faune sauvage présentant des signes d'atteinte par un pathogène connu ou potentiellement émergent et permettant d'isoler, d'identifier, de caractériser et de développer des outils spécifiques et sensibles de première génération, mais également de tester rapidement des solutions thérapeutiques ou vaccinales. Cette saisine s'adresse potentiellement à l'ensemble des espèces de poissons d'eau douce et d'eau de mer. Les recherches plus fondamentales associées aux agents détectés feront l'objet de saisines spécifiques. La quantité d'animaux et les espèces utilisées seront fonction des urgences sanitaires et il est complexe d'en avoir une projection précise. Nous estimons néanmoins qu'un maximum de 10 000 animaux sera utilisé sur la durée totale de l'autorisation.

Le nombre d'animaux sera, pour chaque essai mené, déterminé afin de limiter l'effectif au seuil de la pertinence scientifique et statistique. 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 au 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.

16673 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. Chez la souris, il existe un modèle d'OHN chirurgical lorsque l'on associe une lésion médullaire totale à une injection intramusculaire de cardiotoxine (CTX). Cette lésion et la réaction inflammatoire induite entraînent la formation d'un ostéome en 14 jours. Par ailleurs les observations des cliniciens montrent que l'étendue de la lésion nerveuse et l'inflammation sont des facteurs aggravants dans le développement de la maladie. La souris présente une section médullaire totale qui la rend paraplégique et son immobilité musculaire postérieure est totale. Pour comprendre l'importance de ces observations nous pratiquerons 3 procédures d'étude durant la formation de l'ostéome: une procédure chirurgicale pour provoquer la maladie, une procédure de stimulation magnétique répétitive (rMS) de l'animal entier, et une procédure de traitement par des composés modulateurs de l'inflammation. Dans le respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), nous utiliserons un nombre total de 640 souris sur 5 ans, nombre optimal qui prend en compte la puissance des tests statistiques envisagés (n=20 par groupe correspondant à 10 animaux pour les analyses biochimiques et 10 souris pour les analyses histologiques). Pour étudier la formation de l'ostéome, 5 groupes seront constitués : SCI+CTX (Spinal Cord Injury et injection de cardiotoxine); SCI+PBS (Contrôle de l'opération sans toxine); SHAM+ CTX (Opération sans lésion + cardiotoxine) ; SHAM+PBS (Opération sans lésion + PBS) ; Naïfs (contrôle négatif non opérés).

Pour évaluer l'efficacité du traitement non pharmacologique 2 groupes seront nécessaires (SCI + CTX avec traitement; SCI + CTX avec traitement sham) et 3 groupes seront constitués pour l'évaluation des traitements pharmacologiques (SCI + CTX avec traitement; SCI + CTX avec véhicule; SCI + CTX avec de l'eau (si le véhicule est autre que l'eau)).

Tous les individus seront prélevés 3 j et 14 j après chirurgie.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire pour passer les tests statistiques et éviter les doublons pour les groupes contrôles (réduction).

Afin de respecter le bien-être des animaux (raffinement), une attention particulière sera portée 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. Nous effectuerons une vidange urinaire biquotidienne pendant toute la durée post-chirurgicale. Des analyses biochimiques et histologiques seront pratiquées dans différents prélèvements pour évaluer l'efficacité du traitement.

16674 Il existe un grand intérêt pour les molécules naturelles à visées scientifiques et thérapeutiques. Celles-ci sont par exemple issues des venins d'animaux, constitués de toxines, dont certaines ont déjà fait la preuve de leur grande affinité et haute sélectivité pour leurs cibles naturelles, en faisant ainsi de potentielles molécules thérapeutiques avec peu d'effets indésirables.

Des pathologies comme l'obésité ou la cachexie pourraient être traitées par de telles molécules. Pour cela, nous avons sélectionné un récepteur impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique comme nouvelle cible thérapeutique. Ce récepteur module la prise alimentaire en fonction de son activation ou inactivation. Il est à la fois exprimé dans le cœur et au niveau de l'appareil urinaire.

In vitro, nous avons testé de nombreux venins et nous avons découvert plusieurs toxines intéressantes. Ces dernières ont été synthétisées chimiquement et caractérisées en pharmacologie moléculaire afin de connaître leur affinité, leur sélectivité ainsi que leurs fonctions. Une dizaine d'entre elles montrent des profils pharmacologiques intéressants qu'il faut maintenant relier à des effets *in vivo*. Pour chacune de ces toxines, nous souhaitons étudier, par l'utilisation de dérivés radioactifs ou fluorescents, leur pharmacocinétique, leur toxicité, leur biodistribution et leur passage des barrières physiologiques (gastro-intestinales, hémato-encéphalique et materno-foetale). L'étude du passage de ces barrières permettra de savoir si ces toxines peuvent être absorbées par l'organisme après une ingestion, si elles sont capables d'atteindre le cerveau où se situe le récepteur impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique que nous ciblons et si elles sont sans danger pour le fœtus.

Nous devons effectuer cette étude sur des organismes vivants modèles. Nous avons choisi d'utiliser des rongeurs (souris et rats), qui sont des mammifères de choix pour étudier la pharmacodynamique complexe de l'être humain.

Nous comparerons les résultats de pharmacocinétique, de toxicité, de biodistribution et de passage des barrières physiologiques des toxines suite à l'utilisation de différentes voies d'administration (notamment intraveineuse, sous-cutanée, intracérébrale ou encore orale). Ces comparaisons nous permettront de sélectionner les toxines capables d'atteindre le récepteur que nous ciblons par au moins une des voies d'administration testées. Afin d'évaluer la capacité des toxines présélectionnées à moduler la prise alimentaire, nous mesurerons de manière informatisée la prise alimentaire des rongeurs en continu jusqu'à deux semaines grâce à des cages spécifiques possédant une balance intégrée au bac à nourriture.

Seule la toxine ayant induit la plus significative modification de la prise alimentaire et cela sans toxicité sera étudiée davantage par l'observation de son effet au niveau cardiaque (ECG, pression artérielle, rythme cardiaque, analyses sanguines...) et urinaire (fonctions rénales, diurèses, analyses urinaires...).

L'étude *in vivo* est l'étape finale de caractérisation de nos molécules d'intérêts. En effet, la dizaine de peptides destinés à cette phase est déjà issue d'une sélection chimique (meilleures affinité et sélectivité) puis d'un criblage *in vitro*. De plus, cette étude *in vivo* s'inscrit dans le cadre d'une phase préclinique d'un nouveau traitement de la cachexie chez l'Homme. Il est, par conséquent, indispensable de mener cette étude au niveau d'un organisme entier (« Remplacement »).

L'ensemble de l'étude *in vivo* nécessitera 280 souris et 400 rats, tous issus d'élevages agréés. Conformément à la règle des 3R, il s'agit du nombre minimum d'animaux nécessaires à une analyse statistique fiable de l'ensemble des 10 toxines sélectionnées *in vitro*.

La majorité des voies d'administration n'engendrant qu'une douleur égale à celle d'une piqûre, celles-ci seront réalisées sans anesthésie. Pour les administrations par voie intracérébrale et via l'utilisation de pompes osmotiques, une procédure chirurgicale sera réalisée par des personnes habilitées, le tout en respectant au mieux le bien-être animal. Pour éviter toute souffrance, les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale sur tapis chauffant avec administration d'un analgésique local au niveau du site chirurgical. Si une douleur est détectée, l'administration d'un anti-inflammatoire non-stéroïdien sera réalisé. Un suivi journalier des animaux sera effectué tout au long du projet, avec une attention accrue pendant les 72 heures suivant la procédure. Bien qu'il n'y ait pas, à priori, de douleur, souffrance et angoisse associées à l'administration des composés, une attention particulière sera portée aux points limites définis dans les procédures expérimentales (ex : perte de poids supérieure à 20%, automutilation...) afin qu'ils ne soient pas dépassés. Si l'un des animaux dépassait un tel point limite, l'animal serait retiré de l'expérience et soigné ou euthanasié.

16675 La ciguatéra est une intoxication alimentaire, connue depuis longtemps aux Antilles et consécutive à la consommation de poissons des milieux coralliens littoraux et océaniques accumulant les ciguatoxines CTXs. On distingue les ciguatoxines du Pacifique, des Caraïbes et de l'océan Indien. La toxine P-CTX-1 figure parmi les toxines marines les plus toxiques. Le producteur de cette famille de toxines est une micro-algue benthique *Gambierdiscus toxicus* proliférant épisodiquement sur les substrats coralliens dégradés. Le syndrome clinique associe des symptômes gastro-intestinaux, neurologiques, musculaires, articulaires, cutanées (prurit, d'où l'appellation de « gratte » dans certaines régions), cardiovasculaires, d'intensité variable qui apparaissent 30 minutes à 48h après ingestion du poisson. Il n'existe pas à ce jour de remède spécifique, le traitement est avant tout symptomatique en fonction des signes cliniques présentés par le patient. L'évolution de la maladie est généralement favorable après quelques jours. Mais il n'est pas rare que les troubles de la sensibilité, les douleurs et les démangeaisons persistent plusieurs semaines. Le taux d'incidence de la ciguatera constitue donc un problème de santé publique majeur d'autant qu'il est en augmentation croissante en Martinique et Guadeloupe (respectivement de 0,67 cas et 1,47 cas par an pour 10000 habitants en 2018).

La réglementation européenne interdit la mise sur le marché de poissons contenant des ciguatoxines mais ne précise pas de seuil réglementaire. Or, la France est un des pays européens les plus touchés par cette problématique par la survenue d'intoxications régulièrement rapportées dans certains départements et régions d'outre-mer. En Martinique, Guadeloupe, Polynésie et à La Réunion, des programmes de surveillance épidémiologique de la ciguatera ont été mis en place depuis plusieurs années et permettent d'acquérir des données épidémiologiques tout en gérant au mieux le risque localement. Cette surveillance conduit également à des interventions de prévention et de contrôle ciblées, menées par les Agences régionales de santé (ARS) et les Directions de l'alimentation, de l'agriculture et de la Forêt (DAAF).

La France a pris des mesures pour protéger les populations des territoires d'outre-mer, situées en zones tropicales par le biais d'arrêtés préfectoraux. Ceux-ci interdisent la mise sur le marché de certaines espèces de poissons pêchés localement susceptibles de contenir des CTXs.

Les toxi-infections alimentaires collectives ciguateriques (TIAC) sont systématiquement suivies par les agents en charge de la sécurité sanitaire des aliments. Selon la lettre de diffusion DGAI/SDSSAL/2013/0295 du 10 juillet 2013, qui décrit le protocole de gestion des intoxications alimentaires ciguateriques aux Antilles françaises, les premières investigations se basent sur 3 conditions : un tableau clinique sans équivoque, une espèce de poisson ainsi que la zone de pêche identifiées comme étant à risque.

Si et seulement si ces trois conditions sont réunies, il n'est pas obligatoire que les services de la DAAF transfèrent les échantillons (restant de repas) suspects pour une analyse de confirmation. Si ces trois conditions ne sont pas réunies, après avis des autorités compétentes, les services de la DAAF transfèrent les échantillons alimentaires suspects à un laboratoire agréé par le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation pour analyse de confirmation. Dans tous les cas, les prélèvements des aliments directement liés à ces TIAC sont systématiquement réalisés. Ces échantillons sont laissés à la disposition d'un laboratoire agréé. Ces analyses de confirmation, menées ultérieurement, sont

nécessaires car elles permettent d'une part de confirmer ou non les TIAC et d'autre part d'identifier d'éventuelles nouvelles zones de pêche ou d'espèces de poissons comme étant à risque.

La méthode officielle en France de dosage des ciguatoxines dans la chair de poisson est actuellement le bio essai sur souris répondant ainsi aux exigences du règlement (CE) N° 854/2004.

De fait, ce projet vise à encadrer les analyses officielles de détection des ciguatoxines menées dans le cadre des investigations de toxi-infections alimentaires collectives en Martinique et Guadeloupe réalisées par les laboratoires agréés.

Après extraction et traitement de la chair de poisson, un extrait solubilisé est injecté par voie intrapéritonéale à deux souris. Les souris sont observées pendant 24h. Les symptômes, toute perte de poids significative ou encore la mortalité des souris sont notés et permettent de statuer sur la toxicité globale de l'échantillon.

Le nombre de souris utilisées par an pour la recherche de ciguatoxines fluctue en fonction du nombre d'échantillons reçus pour investigation des TIAC aux Antilles françaises. L'estimation du projet porte sur 100 souris par an (soit 500 sur 5 ans).

Par ailleurs pour répondre aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement de l'article R.214-105, les actions suivantes ont été mises en place : pour réduire le nombre d'animaux, la programmation analytique a été optimisée en cumulant les échantillons avant de lancer une série d'analyse; pour limiter la douleur/souffrance animale, la durée d'observation de 24h imposée dans la méthode officielle est réduite lorsque des symptômes (diarrhées, dyspnée) avant ce délai sont trop importants; enfin, pour remplacer à terme le bio essai sur souris, une méthode par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est en cours de développement, malgré la complexité et les difficultés analytiques rencontrées. Cette méthode chimique, une fois validée, permettra d'identifier et de quantifier dans la chair de poisson les toxines de la famille des ciguatoxines.

16676 La médecine de précision en oncologie est un terme générique large, généralement utilisé pour décrire toutes les ressources utilisées pour la caractérisation des tumeurs, principalement dans le but de sélectionner les médicaments les plus susceptibles d'exercer la meilleure efficacité clinique.

Pendant des décennies, l'amélioration du taux de réponse ou de la survie a été réalisée étape par étape. L'arrivée ces dernières années de médecine dite de précision a été considérée comme une innovation incrémentielle, en effet la survie n'a pas changé de façon spectaculaire.

Inversement, l'immunothérapie a rapidement entraîné une amélioration spectaculaire des résultats cliniques et suscité un nouvel espoir particulièrement dans les cancers du poumon ou les mélanomes (cancers dermatologiques).

Cependant, à ce jour, l'introduction de l'immunothérapie se fait de manière empirique, en s'ajoutant aux traitements existants, sans chercher à revoir les protocoles actuels à la lumière d'une synergie possible.

Néanmoins, des études cliniques académiques ont montré que l'optimisation du schéma d'administration pouvait conduire à des améliorations spectaculaires des résultats cliniques, préconisant ainsi de rechercher de nouvelles méthodes d'administration de ces médicaments et de déterminer le bon dosage, le bon schéma d'administration et le bon séquençage.

Le nombre de combinaisons possibles est énorme et une tentative empirique d'explorer même un nombre réduit de possibilités dépasserait les capacités techniques et matérielles, et requerrait un nombre non éthique d'animaux en raison du grand nombre de conditions à tester.

Ce projet, sur une durée de 6 mois, a pour but de définir les modalités optimales de combinaisons entre chimiothérapie cytotoxique, anti-angiogéniques (thérapie ciblée) et l'immunothérapie.

Le modèle étudié est le cancer du poumon non à petites cellules. Les cellules cancéreuses seront greffées sur des souris immunocompétentes. La greffe est réalisée par une personne formée et habituée à ce geste technique.

Des études *in vitro* préliminaires ont été menées afin de sélectionner les médicaments cytotoxiques et anti-angiogéniques présentant les profils immunomodulateurs les plus pertinents, ainsi que les doses à administrer.

Ces études *in vitro* ont permis de réduire le nombre de traitement (2 traitements cytotoxiques et 1 traitement anti-angiogénique), les posologies et les schémas des traitements choisis (1 schéma fixe pour les cytotoxiques et 2 schémas, concomitant et séquentiel pour l'anti-angiogénique).

Néanmoins les mécanismes immunomodulateurs de ces traitements sont complexes et nécessitent pour être étudiés le recours au modèle animal.

Le projet se décompose en 2 étapes :

- Une étude immunomodulatrice des traitements conventionnels (chimiothérapie et thérapie ciblée) sur 60 animaux (69 animaux greffés au total, on estime le pourcentage de taux d'échec de greffe à 15%).

Cette première étude permet la sélection des schémas thérapeutiques permettant la meilleure réponse immunomodulatrice. Cette étude *in vivo* et *in silico* permet l'optimisation des schémas thérapeutiques et la diminution du nombre d'animaux utilisés pour l'étude d'efficacité.

- Une étude d'efficacité de l'immunothérapie combinée aux traitements conventionnels sur 77 animaux (88 animaux au total en tenant compte du taux d'échec de greffe).

Les différentes étapes permettant l'analyse : administration des traitements, prélèvements sanguins, etc seront effectués par des personnes formées à la réalisation de ces gestes. Ces gestes seront réalisés sur des animaux sous anesthésie et sous analgésie. Pour chacune de ces études les animaux seront suivis par une personne formée au bien être animal.

Les 157 souris (animaux du même âge et de même sexe) seront hébergées au maximum au nombre de 6 dans des cages enrichies de 365*207*140 mm. L'enrichissement comporte : des dômes ou igloo en plastique ainsi que carrés de coton permettant le jeu et la nidation des animaux.

Les souris seront surveillées quotidiennement une attention particulière sera portée sur leur confort au cours de l'étude. Un traitement antalgique préventif quotidien (ibuprofène) sera mis en place pour chaque animal.

Les points limites de l'étude sont initialement établis afin de réduire l'inconfort des animaux au cours de cette étude.

Lors de ce projet une attention particulière a été portée sur les 3R. C'est en ce sens que nous avons :

- Réduit le nombre d'animaux utilisés. Cette réduction est possible grâce :

- o Aux travaux précédemment réalisés au sein du laboratoire permettant de limiter le nombre de traitements testés,

- o A l'étude immunomodulatrice des traitements conventionnels, permettant la définition des critères d'évaluation de l'efficacité des traitements,

- o A la modélisation mathématique qui permettra de limiter le nombre de protocole testé lors de l'étude d'efficacité de l'immunothérapie combinée aux traitements conventionnels.

- Raffiné, par la définition de points limites lors de cette expérimentation.

- Remplacé, le modèle animal lorsque cela a été possible, par :

- o Des expérimentations *in vitro* sur cellules cancéreuses murines. Réalisation de tests de cytotoxicité 2D et 3D,

- o Des expérimentations *in vitro* sur cellules immunitaires murines afin de définir des concentrations limites de toxicité des cytotoxiques sur ces cellules,

- o La recherche de marqueurs de réponse aux protocoles mis en place *in vitro* sur cellules cancéreuses murines,

- o La construction et l'actualisation d'un modèle mathématique *in silico*.

16677 Depuis quelques années, on observe dans les domaines de la santé humaine ou de la santé animale un développement important de biosenseurs automatiques et intégrés permettant de mesurer en continu des paramètres biologiques importants pour connaître l'état de santé des individus appareillés représentatifs de l'état du groupe. L'utilisation à moyen terme de telles approches sur quelques individus 'sentinelles' dans l'élevage des poissons constitue maintenant un enjeu important. En outre, à court terme, l'utilisation de biosenseurs en expérimentation animale pourra favoriser le

développement de conditions plus éthiques (réduction du nombre d'animaux utilisés, suivi du bien-être des poissons). Ce biosenseur (dimension :15 x 6 x 6 mm, d'un poids de 8grs environ), placé sur l'opercule du poisson, permet à la fois d'enregistrer les déplacements physiques du poisson dans le bassin et les battements de l'opercule, et donc d'avoir une mesure directe de l'activité et de la fréquence respiratoire du poisson. Des premiers essais pour un nouveau biosenseur ont déjà été réalisés avec succès chez le bar et la daurade. Pour pouvoir utiliser ce matériel chez la truite, des premiers tests ont été réalisés au printemps 2019 et ont permis de comparer différentes techniques d'accrochage du biosenseur sur le poisson. De ces essais il ressort que l'attachement du biosenseur avec de la colle sur un morceau de plastique lui-même suturé sur l'opercule avec un fil chirurgical est la seule technique n'ayant pas d'effets négatifs (nécrose, inflammation...) sur l'opercule ou les filaments branchiaux sous-jacents.

L'objectif de cette demande est i) de confirmer l'absence d'effet négatif sur les tissus de cette technique d'accrochage du biosenseur pour laquelle nous apporterons des légères modifications par rapport aux premiers tests (mise en place du biosenseur en une seule manipulation) ii) de vérifier l'absence d'effet de la pose du biosenseur sur la croissance individuelle des poissons iii) mesurer les effets d'un stress hypoxique aigu sur les paramètres enregistrés par le biosenseur. Afin de pouvoir suivre individuellement ces poissons, ils seront préalablement marqués individuellement par pit-tag. Pour le protocole d'accrochage du biosenseur, un dispositif comprenant un morceau de plastique sur lequel est collée la gaine de caoutchouc est préparé en amont. Ce dispositif est suturé sur l'opercule du poisson avec un fil chirurgical, puis le biosenseur est disposé dans la gaine en caoutchouc. Nous utiliserons des truites de poids moyen ~500 grs. Nous comparerons 2 groupes de poissons, un lot témoin de 36 poissons sans biosenseur et un lot de 20 poissons sur lesquels un biosenseur fonctionnel aura été implanté sur l'opercule de chaque poisson. Ces deux groupes de poissons seront répartis dans 6 bacs différents dans lesquels nous aurons ainsi 3-4 poissons implantés et 6 poissons témoins/bac. Ce nombre a été choisi pour avoir ainsi, dans chaque bac, une densité d'élevage optimale (~15kg/m³). Les poissons implantés ou témoins seront suivis individuellement une fois par semaine pendant 3 semaines. Nous analyserons les paramètres suivants caractéristiques de l'état de santé des poissons : intégrité corporelle, intégrité de l'opercule et du tissu branchial sous-jacent (recherche de signes d'inflammation ou de nécrose à proximité de la zone de fixation du biosenseur), suivi individuel de la taille et du poids. En outre nous réaliserons un suivi journalier du comportement des poissons dans les bacs d'élevage. Enfin, pour l'étude des effets d'un stress d'hypoxie, les poissons de 3 bacs expérimentaux (contenant chacun des poissons implantés et des poissons témoins) seront exposés pendant 2h à des niveaux bas d'oxygène (3-4,5 mg/l) pendant que les poissons des 3 autres bacs seront gardés en conditions de normoxie (valeur d'oxygène proche de la saturation). Les paramètres analysés avec les biosenseurs seront l'activité respiratoire (mesuré à travers les battements de l'opercule) et l'activité du poisson (mesurée à travers le déplacement du poisson). Outre ces informations fournies par les biosenseurs, nous mesurerons plusieurs paramètres de l'eau (oxygène, CO₂, ammoniac et cortisol) qui nous confirmeront que les poissons ont bien été exposés à un stress aigu d'hypoxie. Le nombre total de truites arc-en-ciel utilisées dans ce projet sera de 56. Le projet prend en compte la règle éthique des 3R :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car le but du projet est de tester sur des poissons vivants une technique d'accrochage de biosenseurs et les effets d'un stress aigu d'hypoxie.

- Réduire : Le nombre de poissons utilisés est adapté au plus juste pour permettre une évaluation statistique de la variabilité individuelle de la réponse à l'accrochage du biosenseur.

- Raffiner : les informations sur ces paramètres biologiques seront réalisées sur des poissons vivants (comportement) ou anesthésiés (taille, poids, intégrité corporelle, recherche d'inflammation). Le protocole permettra de décider d'une interruption de l'expérimentation en cas de franchissement du point-limite. Les critères de franchissement des points limites seront les suivants : durant toute l'expérimentation, si les poissons ne mangeaient plus ou avaient un comportement atypique tel que la nage sur le dos ou en vrille, une fuite anormale à l'alimentation, une léthargie, une hyperactivité locomotrice, l'expérimentation serait interrompue et les animaux concernés seraient euthanasiés. Les densités d'élevage des truites durant l'expérience sont très inférieures à celles utilisées en pisciculture

de truite et les paramètres de qualité d'eau sont suivis de manière journalière, de même que le contrôle de la prise alimentaire et les mortalités.

16678 L'hyperkaliémie est un trouble électrolytique qui peut causer de sévères altérations des fonctions cardio-vasculaires. Sa prévalence dans la population des insuffisants rénaux est particulièrement élevée (40 %) comparée à la population générale (1 % à 2 %). Ceci s'explique par le fait que les patients souffrant d'insuffisance rénale ne peuvent excréter correctement la charge en potassium qu'ils ingèrent quotidiennement.

Face à cette difficulté, l'organisme tente de s'adapter en augmentant l'excrétion de potassium par voie intestinale. C'est aussi sur ce principe que sont basées certaines approches thérapeutiques visant à diminuer la kaliémie en capturant le potassium par une résine cationique non-assimilable. Cependant, l'efficacité et l'innocuité de ces composés semblent aujourd'hui remises en question.

Face à cette problématique, nous poursuivons deux objectifs :

- Elucider de façon précise les mécanismes de la régulation du bilan potassique dans un modèle de souris insuffisante rénale chronique (IRC) par néphrectomie subtotalaire.
- Etudier l'implication de la H, K-ATPase de type 2 (HKA2) dans la normalisation de la kaliémie au cours de l'insuffisance rénale.

Nous avons déjà pu caractériser les mécanismes de la régulation du bilan potassique dans le modèle murin d'insuffisance rénale par une néphrectomie 5/6ème (N5/6). Nous avons, également, apporté la preuve de concept que l'inhibition de la réabsorption du potassium par la H, K-ATPase de type 2 peut contribuer à normaliser la kaliémie au cours de l'insuffisance rénale.

Néanmoins, il nous reste plusieurs points et hypothèses à valider pour atteindre nos objectifs :

- Question 1 : Evaluer et mesurer l'impact de la présence ou de l'absence de la HKA2 dans le développement de la fibrose rénale induite par une charge chronique en K⁺ sous traitements thérapeutiques de références utilisé dans la prise en charge de l'insuffisance rénale chronique, dans le modèle murin d'insuffisance rénale par une néphrectomie 5/6ème.
- Question 2 : Etudier les effets de la présence ou de l'absence de la HKA2 sur l'état acido-basique, dans le modèle murin d'insuffisance rénale par une néphrectomie 5/6ème.
- Question 3a : Etudier les effets de la balance sodique et son impact sur la pression artérielle mesurée avec une méthode non invasive en la présence ou en l'absence de la HKA2, dans le modèle murin d'insuffisance rénale par une néphrectomie 5/6ème.
- Question 3b : Etudier les effets de la balance sodique et son impact sur la pression artérielle mesurée avec une méthode invasive en la présence ou en l'absence de la HKA2, dans le modèle murin d'insuffisance rénale par une néphrectomie 5/6ème. Cette question ne sera réalisée que si nous ne visualisons pas de différence avec la technique de mesure de la pression artérielle non invasive.
- Question 4 : Etudier les effets à long terme du lien entre la régulation du potassium et le glucose via l'implication de l'insuline, dans le modèle murin d'insuffisance rénale par une néphrectomie 5/6ème.

Pour ce faire, une insuffisance rénale chronique par une néphrectomie 5/6ème (N5/6) sera établie chez des souris normales (Wild Type) et chez des souris transgéniques, n'exprimant pas la HKA2 (HKA2 KO) et leurs paramètres métaboliques et rénaux seront analysés, dans différents contextes expérimentaux nous permettant ainsi de répondre à nos questions.

Le modèle de l'insuffisance rénale chronique est un modèle complexe qui nécessite une étude à l'échelle de l'organisme entier. Nos objectifs scientifiques ne nous permettent pas de recourir à des modèles de substitution *in vitro*. Toutefois, nous collaborons avec des spécialistes de programmes de modélisation informatique. Cela nous permet de simuler certaines hypothèses et ainsi d'orienter et d'affiner nos protocoles pour limiter le nombre d'animaux nécessaires à valider nos hypothèses.

De plus, lors de la construction de notre projet, nous avons pris soin de mener une réflexion statistique du fait du nombre de variables (fonction rénale, génotype, traitement ou régime), afin de réduire tant que possible le nombre d'animaux utilisés. A noter, que nous aurons besoin de 12 souris par lot pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés et pour pouvoir apprécier les différents résultats. Nous aurons donc besoin de 480 souris au maximum pour répondre à nos questions. Ce

chiffre pourra être baissé à 384 souris si comme expliqué précédemment, la méthode de mesure non invasive de la pression artérielle nous permet de visualiser une différence entre les groupes.

Tout au long de notre projet, nous veillons à garantir le bien être de nos animaux en enrichissant leur hébergement avec du matériel de nidification, en les habituant aux dispositifs expérimentaux et en ayant systématiquement recourt à des anesthésiques et à des analgésiques, dans les interventions chirurgicales. Les protocoles thérapeutiques de prise en charge de la douleur et les critères d'interruption d'expérimentation ont été définis avec soin afin de garantir le bien être des animaux au cours de l'étude.

De plus, nos modèles de souris intéressent d'autres équipes qui travaillent sur des sujets de recherche différents et qui pourront étudier l'impact de l'insuffisance rénale sur d'autres organes que nous n'allons pas étudier.

16679 Les anticorps sont aujourd'hui parmi les molécules les plus attractives pour le traitement de pathologies comme le cancer et l'arthrite, leurs spécificités et leur capacité à être ingénierés en font des traitements en constante évolution. L'objectif du projet est de développer un procédé de délivrance contrôlé pour les anticorps monoclonaux dans différentes pathologies. En augmentant les concentrations locales et en réduisant les effets secondaires potentiels, le système de relargage pallierait aux limites des traitements anticorps. La clairance des anticorps peut être réduite par des bio-polymères comme le PEG-PLA largement utilisé grâce à sa bonne biocompatibilité, biodégradabilité et capacité à relarguer des doses spécifiques.

Les maladies arthritiques et le cancer sont des préoccupations importantes des autorités de santé. Le projet a pour but la mise au point de traitements à effet locaux prolongés pour différentes pathologies. La stratégie consiste à injecter localement des composés qui permettent une libération prolongée des agents thérapeutiques. Nous allons évaluer les capacités thérapeutiques des molécules intégrées dans celui-ci.

Le projet repose sur le système de libération prolongé. La voie d'injection de la molécule intégrée dans le polymère sera locale (sous-cutanée). La molécule testée ici, le rituximab, est utilisée dans le traitement de différents lymphomes et de la polyarthrite rhumatoïde. La fonctionnalité de la molécule dans le système de relargage va être établie dans un modèle de souris mutantes immunodéprimées. L'un des objectifs est de mettre en place un modèle qui permet de tester le ciblage spécifique et local des cellules B humaine *in vivo*. Nous effectuerons une injection de cellules B humaines dans des souris immunodéprimées de façon à tester, après implantation de la formulation libérant le Rituximab, le ciblage spécifique de ces cellules. Ce modèle permet d'étudier la capacité du Rituximab encapsulé dans la formulation polymérique à détruire des cellules B humaines.

Nous avons donc déterminé un programme de travail sur les 12 mois qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Le nombre d'animaux pour chaque procédure est maximal (Maximum envisagé : 24) soit 96 souris avec un total de 4 procédures et sera revu si besoin pour tenir compte de la règle des 3R.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel (Gpower) permettant d'évaluer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer (données préliminaires obtenues dans d'autres expériences réalisées au laboratoire)

- 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 au maximum. Dans les groupes de souris arthritiques, il n'est pas possible d'administrer de traitements anti-inflammatoires qui interféreraient avec l'expérimentation. Par ailleurs, l'utilisation d'antalgiques à base de morphiniques dans nos études précliniques n'est pas non plus envisageable, car elle conditionnerait l'utilisation de dérivés opioïdes chez l'homme au cours des essais cliniques. Cependant, dans le cas où certains signes de souffrance seraient observés, dans le modèle un traitement oral avec du paracétamol sera mis en place ou les animaux seront euthanasiés en fonction de la gravité.

- Remplacement : afin de proposer un traitement chez l'homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique dans un modèle pré-clinique pertinent chez l'animal. Des modèles *in vitro* ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité du système et ne sont pas adaptés à ses propriétés de libération contrôlée. Plusieurs sous-types d'arthrite existent chez l'homme, il est donc nécessaire de mettre en place des modèles *in vivo* reproduisant le plus fidèlement possible les atteintes humaines.

16680 Les cellules microgliales sont les cellules sentinelles du cerveau. Elles maintiennent l'homéostasie cérébrale au travers d'une constante motilité de leurs processus et la capacité à phagocyter des débris cellulaires ou tout élément susceptible de perturber l'équilibre cérébral. Ces propriétés sont impliquées dans la mise en place d'une architecture neuronale fonctionnelle pendant le développement. Nos résultats antérieurs ont montré que la nutrition lipidique, et plus spécifiquement une carence nutritionnelle en oméga-3, modulait l'activité phagocytaire de la microglie. Notre projet vise à étudier les mécanismes d'actions des oméga 3 sur la régulation de l'activité microgliale et notamment la phagocytose. Les animaux seront issus de mères nourries avec un régime déficient ou supplémenté en oméga 3 au cours de la période périnatale : du premier jour de gestation jusqu'au sevrage. Grâce aux données précédemment accumulées et notamment grâce à des modèles *in vitro* permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous avons identifié des AGPI (acides gras poly-insaturés) d'intérêt dont nous étudierons plus précisément les voies enzymatiques et de signalisation. Dans un premier temps, toujours dans un souci de respect des 3 R (réduire, remplacer, raffiner) nous passerons par un modèle ex-vivo. Nous extrairons les cellules microgliales à la fin du développement (J21) pour pouvoir les exposer à différentes drogues candidates permettant de stimuler ou inhiber ces voies de signalisation. Une fois les molécules actives identifiées nous passerons à la validation in-vivo de nos hypothèses en injectant directement les activateurs/inhibiteurs aux souris. Pour observer l'effet des différentes molécules, les souris passeront des tests comportementaux révélant leurs compétences mnésiques. Ces mêmes animaux pourront ensuite être utilisés pour les mesures neurobiologiques. Leurs cerveaux seront extraits pour y mesurer l'activité électrique, la phagocytose microgliale, observer l'architecture neuronale et quantifier les marqueurs moléculaires des différentes voies de signalisations. Enfin un groupe d'animaux sera étudié à l'âge adulte pour observer les effets au long terme du régime carencé en oméga 3 et notamment tester la possibilité d'un « correction » des effets développementaux grâce à un changement de régime après le sevrage.

Traditionnellement les travaux de recherche sont effectués sur des individus mâles pour s'affranchir des cycles hormonaux et ainsi obtenir une moindre variabilité des résultats. Cependant de plus en plus de données (chez l'animal et l'humain) montrent que les résultats obtenus chez les mâles et notamment l'efficacité de molécules bioactives ne sont pas nécessairement applicables aux femelles. Y compris à des stades précoces du développement durant lesquelles les femelles ne montrent pas encore de cycles hormonaux. C'est pourquoi nous souhaitons également inclure les femelles à notre étude. Cela nous permettra d'obtenir des résultats pertinents dans notre contexte nutritionnel en tenant compte des différences de métabolisme entre les sexes. Ce travail est clef pour la compréhension du développement du cerveau et plus particulièrement dans un contexte de carence en oméga3 que représente le régime alimentaire occidental.

Nombre total d'animaux utilisés : 1232

Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques classiques. Nous avons, quand il était possible, remplacé les animaux vivants par des modèles *in vitro*. Les étapes finales ne peuvent s'affranchir de l'organisme dans son intégralité. Nous prenons enfin en compte le bien-être des animaux via l'enrichissement des cages, la stabulation en cages collectives, la prise en charge de la douleur si nécessaire et l'euthanasie des animaux si les points limites sont atteints (cf. détails dans la suite de la demande et tableau annexe « Points limites »).

16681 L'ischémie-reperfusion est un phénomène inévitable en transplantation d'organe ou durant une chirurgie vasculaire, impliquant un désordre métabolique majeur. L'ischémie correspond à la phase où l'organe est privé de la circulation sanguine. La reperfusion de l'organe se traduit par la reprise de la circulation sanguine et donc des apports en nutriments et oxygène. La séquence d'ischémie-

reperfusion peut entraîner des lésions sévères, à l'origine de dysfonctions des tissus/organes à court et long terme et potentiellement du rejet du greffon dans le cas d'une transplantation. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes, définir des cibles et développer des stratégies afin de limiter ces lésions d'ischémie-reperfusion. Certains travaux montrent qu'il y a une augmentation de l'expression de monocarboxylate transporter 1 (MCT1, transporteur du lactate) et du métabolisme du lactate dans un modèle rongeur d'ischémie cardiaque. Cependant aucun travail n'a été réalisé sur le rôle de MCT1 dans un modèle d'ischémie reperfusion rénale. L'objectif de cette étude est de définir le rôle de MCT1 dans la genèse des lésions d'ischémie-reperfusion. Notre hypothèse est que la régulation des transporteurs MCT1 peut être une cible dans le but de limiter les lésions d'ischémie reperfusion rénale. Pour ce projet nous utiliserons 372 animaux au maximum (souris C57Bl/6J mâles âgées de 12 semaines).

La règle des 3R 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 d'une séquence d'ischémie-reperfusion. 2) Le nombre d'animaux par groupe (12 animaux/groupe) est réduit au maximum, justifié et défini par un calcul 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 avec enrichissement du milieu adapté à l'espèce afin d'éviter l'ennui et suivi quotidien de leur état de santé. De plus les traitements anesthésiques et analgésiques (par l'utilisation d'antalgiques en préventif et en curatif) seront mis en place dans le but de minimiser la souffrance des animaux.

16682 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 intranasale 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 aigue. Le type d'IRM utilisé est l'IRM rehaussée 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 pourront 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. Différent enrichissement 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 fait sous anesthésie générale.

16683 Les maladies dégénératives des motoneurones, telles que les amyotrophies spinales (SMA), nécessitent de nouvelles approches thérapeutiques. En effet bien que de nouveaux essais de thérapie

génique pour la SMA soient en cours de développement, aucun traitement n'est curatif et il semble nécessaire de les associer à des thérapies complémentaires. L'analyse de ces maladies affectant le système locomoteur, aussi bien dans sa mise en place que dans sa régénération, implique des relations complexes entre les différents tissus (cartilage, tendon, tissu musculaire et tissu nerveux). De fait, une meilleure caractérisation du développement des structures neuromusculaires et des molécules clés impliquées dans ces processus est d'une importance capitale pour tenter, à terme, de trouver de nouvelles approches potentiellement thérapeutiques pour ces maladies.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet dont l'objectif est d'identifier de nouvelles molécules clés impliquées dans le développement neuromusculaire normal et qui pourraient jouer un rôle dans l'évolution des maladies neurodégénératives.

L'étude du développement normal et pathologique des structures neuromusculaires repose sur l'interaction de nombreux facteurs multi-cellulaires et multi-tissulaires, difficiles à reproduire *in vitro*. De plus, l'étude de l'âge embryonnaire impose d'utiliser des modèles animaux facilitant la visualisation et la manipulation des embryons, tels que le xénope. Celui-ci se développe à l'extérieur de la femelle, à température ambiante, dans des oeufs de grande taille (1.2mm). On peut facilement provoquer la surexpression ou l'inactivation de molécules cibles par simple micro-injection dans ces œufs.

Le xénope est le modèle de référence pour l'étude de la compartimentation des somites (vertèbres, tendons et muscles du tronc et des membres), la mise en place du tissu musculaire et de la jonction neuromusculaire dont les mécanismes sont conservés au cours de l'évolution. Il n'existe pas de méthode alternative fiable.

Notre projet s'articule donc autour d'une unique procédure encadrant la prise en charge et le bien-être des femelles afin de produire des ovocytes par injection hormonale. Ces ovocytes seront ensuite fécondés *in vitro*. La fécondation *in vitro* est une approche essentielle en laboratoire afin d'assurer un raffinement par optimisation des succès de fécondation, ainsi qu'une réduction des animaux nécessaires pour obtenir le nombre d'embryons utile aux analyses. Cette fécondation garantit une bonne synchronisation entre les embryons et permet de réaliser des injections contrôlées et reproductibles dans les premières heures post-fécondation.

Les embryons obtenus seront ensuite manipulés et analysés par des approches de biologie cellulaire et moléculaire à des stades de développement très précoces, donc hors champ d'application de la réglementation.

Pour l'ensemble du projet, et sur 5 ans, nous utiliserons 104 xénopes femelles, qui seront gardées en vie toute la durée du projet.

La règle des 3R sera respectée en limitant le nombre d'animaux utilisés au strict minimum permettant de produire le nombre nécessaire d'embryons afin de valider de manière statistique les résultats obtenus. Les xénopes adultes font l'objet d'un suivi quotidien avec pour objectif l'amélioration de leur habitat avec enrichissement du milieu (tunnel et nénuphar en plastique). Dans le cas d'animaux malades, des points-limites ont été établis pour limiter la souffrance et permettre leur prise en charge adaptée.

Ce projet fondamental devrait permettre non seulement de mieux caractériser la mise en place du tissu musculaire et de la jonction neuromusculaire au cours du développement précoce normal, mais aussi devrait ouvrir de nouvelles approches thérapeutiques dans la SMA. A terme, ce modèle animal pourrait permettre de tester de nouvelles molécules protectrices dans les maladies touchant les somites et la jonction neuromusculaire.

16684 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 aggravants. 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, ce projet est basé sur l'utilisation de 256 animaux sur 5 années de recherche.

16685 En élevage porcin, la conduite en bande présente de nombreux avantages pour la gestion de lots de femelles synchronisées (inséminations le même jour, surveillance des mises-bas et soins aux porcelets facilités) et l'organisation de l'élevage (lots homogènes de porcelets, utilisation optimale des bâtiments, nettoyage des locaux entre bandes, vide sanitaire). Pour créer les bandes, les éleveurs réalisent une synchronisation des cycles de reproduction des femelles en distribuant dans l'alimentation pendant 18 jours un analogue de progestérogène (progestagène de synthèse). Toutefois, l'utilisation d'hormones de synthèse pour la conduite des élevages a des impacts négatifs connus sur l'environnement et la santé humaine. De plus, le cahier des charges pour l'élevage biologique interdit d'avoir recours aux hormones de synthèse, mais il n'existe pas d'alternative pour la synchronisation des cycles dans les systèmes de production biologique.

Afin de développer des alternatives aux traitements hormonaux pour la synchronisation des cycles de reproduction, l'objectif de cette étude prospective est de tester un substitut naturel aux progestagènes de synthèse.

De nombreuses études montrent que le gattilier ou « poivre des moines » (*Vitex agnus-castus*) a un effet progestagène. L'ingestion d'extraits de fruits du gattilier augmente les taux sanguins de progestérogène chez la souris, la ratte, la vache et la femme et augmente la durée de la phase lutéale chez la vache et la femme.

Afin de tester l'effet du gattilier en élevage porcin, nous remplacerons la distribution dans l'alimentation des hormones de synthèse par la distribution de cette plante.

Nous utiliserons exactement 4 lots de 6 cochettes soit 24 femelles pubères

- 1 lot témoin négatif qui ne recevra aucune supplémentation,
- 1 lot témoin positif qui recevra le progestagène de synthèse,
- 2 lots supplémentés avec l'extrait de fruits du gattilier à 2 doses différentes.

Les études de toxicité réalisées chez la souris n'ont pas mis en évidence de toxicité aux doses choisies. Aucune toxicité n'a été observée chez la femme

Nous mesurerons :

- les consommations moyennes (mesure de la quantité distribuée et des refus),
- l'intervalle entre deux chaleurs par détections quotidiennes des chaleurs au verrat,
- la concentration de progestérone dans le sang 15 et 19 jours après la première chaleur et dans la salive tous les 5 jours, ces marqueurs permettant d'évaluer le stade du cycle.

Pour le dosage de la progestérone sanguine, pour chaque femelle, 2 prises de sang seront réalisées dans la veine jugulaire lors d'une distribution d'eau sucrée permettant l'immobilisation, dans la mesure du possible, ce qui permet des prélèvements sans contention et sans stress pour l'animal.

La règle des 3R a été prise en compte :

- Remplacement : l'utilisation de l'animal est nécessaire pour documenter les réponses hormonales et comportementales.
- Réduction : Un calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'animaux à inclure dans le projet. Le nombre et la fréquence des prises de sang pour le suivi hormonal a été réduit au minimum. Par ailleurs des collectes de salive, non invasives et non stressantes (simple présentation d'un coton à mâchouiller) seront réalisées, afin de mettre au point des dosages hormonaux dans la salive qu'il. Remplaceront à terme les dosages sanguins.
- Raffinement : Les conditions d'hébergement sont raffinées par la mise à disposition d'une litière constituée d'une couche épaisse de paille, permettant une activité de fouille et de comportement exploratoire tel que préconisé dans le cadre des recommandations européennes (rapport EFSA). Les prélèvements de sang sont réalisés dans la veine jugulaire lors d'une distribution d'eau sucrée permettant l'immobilisation, ce qui permet des prélèvements sans contention et sans stress pour l'animal.

16686 Contexte : La greffe pulmonaire est une solution thérapeutique ultime appliquée lors d'insuffisance respiratoire grave. La demande de greffes pulmonaires est en augmentation constante. Toutefois la survie à 5 ans est moins bonne que celle d'autres organes solides et atteint environ 50%. Après la greffe pulmonaire, environ 30% des patients présentent une dysfonction primaire aiguë (appelée PGD pour primary graft dysfunction) dans les 72h, qui est de mauvais pronostic. Pour pallier le manque de greffons, une technique récente de pré conditionnement qui consiste à perfuser les poumons donneurs à 37°C et à les ventiler pendant environ 6 heures (technique EVLP pour *ex vivo* lung perfusion), permet de rendre des greffons de qualité insuffisante pour la greffe pleinement fonctionnels et acceptables pour la transplantation. De plus, il est apparu que cette technique de pré conditionnement, qui s'adresse à ces poumons de qualité insuffisante, conduit néanmoins à une réduction de l'apparition des PGD graves. Toutefois la survie à long terme ne semble pas améliorée.

Objectif : L'EVLP est un progrès pour augmenter le nombre de greffons utilisable mais il est nécessaire d'améliorer la technique pour réduire les PGD et les rejets de greffons. Pour le moment, l'EVLP pratiquée en clinique se fait en circuit fermé et ne comporte pas l'élimination des déchets biologiques produits par l'organe conditionné. Nous proposons d'associer une dialyse durant l'EVLP (mimer la présence d'un rein pour éliminer les déchets) et d'administrer des traitements pour moduler la réponse immunitaire durant la perfusion afin de minimiser la réponse inflammatoire délétère par les cellules du greffon lors de la transplantation. Cette stratégie de pré conditionnement doit être évaluée dans un modèle animal pertinent, avant de l'appliquer chez l'homme. Le porc est le meilleur modèle, en raison des similarités anatomiques et immunologiques avec l'homme. Dans ce modèle porc nous vérifierons qu'il existe une compatibilité limitée pour les groupes tissulaires entre animaux afin de mimer au mieux le modèle humain. Nous testerons 5 protocoles de pré-conditionnement de poumon, et nous identifierons aussi des biomarqueurs péri-opératoires sanguins et pulmonaires associés au pré conditionnement, à l'apparition ou non de PGD et de rejet.

Bénéfices scientifiques : Ce projet permet de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le pré conditionnement (EVLP et ses améliorations), dans la PGD et le rejet du greffon.

Bénéfices médicaux : Si l'amélioration du pré conditionnement des greffons, est démontrée par une réduction de PGD et de rejet dans le modèle porcin, elle sera rapidement transposée à la pratique clinique humaine. L'enjeu majeur est d'augmenter la survie des patients greffés.

Principe des 3R : Remplacer: il n'est pas possible d'évaluer l'apparition de PGD et de rejets de greffe *in vitro*, car il s'agit d'une réponse globale et complexe, faisant intervenir de multiples paramètres cellulaires du greffon et du système immunitaire du receveur (multiples populations cellulaires, localisées à la fois dans le sang, les ganglions lymphatiques, la rate, la moelle osseuse).

Réduire: la conduite du projet nécessite au maximum 76 porcs (Large White, 55-60 kg) et tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux. Ce projet implique l'utilisation de cinq groupes de 7 donneurs et 7 receveurs soit 70 animaux plus 3 donneurs et 3 receveurs soit 6 animaux dans le groupe de base sans pré conditionnement pour valider toutes les procédures utilisées (inclus dans l'étude si succès).

Raffiner: Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés pendant au moins 14 jours en loges par groupes de deux à quatre. Le milieu sera enrichi par des chaînes et des ballons. Ils seront habitués à la présence humaine 5 fois par jour. Ils seront habitués aux conditions de vie pré et postopératoire par des essais courts dans les différentes conditions d'hébergement et de manipulation. Les animaux les plus calmes et dociles seront choisis en priorité comme receveur. Durant tout leur parcours opératoire et postopératoire, un suivi avec score clinique sera fait et une délivrance d'antalgique sera assurée. Par ailleurs en plus d'une présence humaine régulière un autre animal sera utilisé en compagnon dès que possible lors des séjours en cages pour limiter l'isolement.

16687 Contexte : La greffe pulmonaire est une solution thérapeutique ultime appliquée lors d'insuffisance respiratoire grave. La demande de greffes pulmonaires est en augmentation constante. Toutefois la survie à 5 ans est moins bonne que celle d'autres organes solides et atteint environ 50%. Après la greffe pulmonaire, environ 30% des patients présentent une dysfonction primaire aiguë (appelée PGD pour primary graft dysfunction) dans les 72h, qui est de mauvais pronostic. Pour pallier le manque de greffons, une technique récente de pré conditionnement qui consiste à perfuser les poumons donneurs à 37°C et à les ventiler pendant environ 6 heures (technique EVLP pour *ex vivo* lung perfusion), permet de rendre des greffons de qualité insuffisante pour la greffe pleinement fonctionnels et acceptables pour la transplantation. De plus, il est apparu que cette technique de pré conditionnement, qui s'adresse à ces poumons de qualité insuffisante, conduit néanmoins à une réduction de l'apparition des PGD graves. Toutefois la survie à long terme ne semble pas améliorée.

Objectif : L'EVLP est un progrès pour augmenter le nombre de greffons utilisable mais il est nécessaire d'améliorer la technique pour réduire les PGD et les rejets de greffons. Pour le moment, l'EVLP pratiquée en clinique se fait en circuit fermé et ne comporte pas l'élimination des déchets biologiques produits par l'organe conditionné. Nous proposons d'associer une dialyse durant l'EVLP (mimer la présence d'un rein pour éliminer les déchets) et d'administrer des traitements pour moduler la réponse immunitaire durant la perfusion afin de minimiser la réponse inflammatoire délétère par les cellules du greffon lors de la transplantation. Cette stratégie de pré conditionnement doit être évaluée dans un modèle animal pertinent, avant de l'appliquer chez l'homme. Le porc est le meilleur modèle, en raison des similarités anatomiques et immunologiques avec l'homme. Dans ce modèle porc nous vérifierons qu'il existe une compatibilité limitée pour les groupes tissulaires entre animaux afin de mimer au mieux le modèle humain. Nous testerons 5 protocoles de pré-conditionnement de poumon, et nous identifierons aussi des biomarqueurs péri-opératoires sanguins et pulmonaires associés au pré conditionnement, à l'apparition ou non de PGD et de rejet.

Bénéfices scientifiques : Ce projet permet de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le pré conditionnement (EVLP et ses améliorations), dans la PGD et le rejet du greffon.

Bénéfices médicaux : Si l'amélioration du pré conditionnement des greffons, est démontrée par une réduction de PGD et de rejet dans le modèle porcin, elle sera rapidement transposée à la pratique clinique humaine. L'enjeu majeur est d'augmenter la survie des patients greffés.

Principe des 3R : Remplacer: il n'est pas possible d'évaluer l'apparition de PGD et de rejets de greffe *in vitro*, car il s'agit d'une réponse globale et complexe, faisant intervenir de multiples paramètres cellulaires du greffon et du système immunitaire du receveur (multiples populations cellulaires, localisées à la fois dans le sang, les ganglions lymphatiques, la rate, la moelle osseuse).

Réduire: la conduite du projet nécessite au maximum 76 porcs (Large White, 55-60 kg) et tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux. Ce projet implique l'utilisation de cinq groupes de 7 donneurs et 7 receveurs soit 70 animaux plus 3 donneurs et 3 receveurs soit 6 animaux dans le groupe de base sans pré conditionnement pour valider toutes les procédures utilisées (inclus dans l'étude si succès).

Raffiner: Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés pendant au moins 14 jours en loges par groupes de deux à quatre. Le milieu sera enrichi par des chaines et des ballons. Ils seront habitués à la présence humaine 5 fois par jour. Ils seront habitués aux conditions de vie pré et postopératoire par des essais courts dans les différentes conditions d'hébergement et de manipulation. Les animaux les plus calmes et dociles seront choisis en priorité comme receveur. Durant tout leur parcours opératoire et postopératoire, un suivi avec score clinique sera fait et une délivrance d'antalgique sera assurée. Par ailleurs en plus d'une présence humaine régulière un autre animal sera utilisé en compagnon dès que possible lors des séjours en cages pour limiter l'isolement.

16688 Notre société est une CRO (Clinical Research Organization– organisme de recherche sous contrat) qui mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique. La présente saisine est donc une saisine générique (vu avec la DSV, le CEEA et le MESR pour la soumission de saisines génériques) qui a pour but d'évaluer de nouveaux principes actifs sur la perte osseuse induite par ovariectomie chez les rongeurs.

L'objectif du projet est d'évaluer l'effet de différents principes actifs sur la perte osseuse induite par ovariectomie chez le rat ou la souris.

Pour chacun des protocoles, 10 animaux par groupe seront étudiés afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remis en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats.

En plus des groupes impliquant les traitements avec les principes actifs, un groupe sham opéré, un groupe ovariectomie traité avec le véhicule et un groupe ovariectomie traité avec un produit de référence seront ajoutés aux protocoles. Les animaux « sham » sont des animaux pour lesquels la chirurgie est réalisée dans les mêmes conditions que les animaux ovariectomisés sauf que les ovaires sont maintenus.

Pour 1 protocole, un maximum de 100 animaux (10 groupes) sera testé.

Nous estimons réaliser 5 études souris et 5 études rats par an, soit un maximum de 500 souris et 500 rats par an. Sur une durée de 5 ans, nous utiliserons donc 2500 souris et 2500 rats.

Pour chacun des protocoles, les animaux subissent une ovariectomie bilatérale à J0. Les animaux sont suivis cliniquement tout au long du protocole et les traitements sont appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. Le produit de référence utilisé dans les protocoles est un bisphosphonate (Alendronate) qui est utilisé comme traitement chez les patientes ostéoporotiques. Il sera administré selon le schéma thérapeutique équivalent au schéma clinique par injection sous-cutanée.

Des prélèvements de fluide biologique peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang et/ou les urines et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse NFS par exemple.

Afin d'évaluer la vitesse de néoformation osseuse dans les membres inférieurs, les animaux recevront une double injection de fluorochromes ayant la capacité de fixer le calcium pendant le processus de minéralisation. Les injections seront faites par voie sous-cutanée avant leur euthanasie.

La durée des procédures est variable selon la posologie des principes actifs et peut aller de 2 semaines à 5 mois. A l'issue des protocoles in-vivo, les animaux sont sacrifiés et les membres inférieurs sont prélevés pour une analyse en imagerie et en histologie.

Les utérus sont également pesés afin de vérifier la déficience en œstrogène générée par l'ablation des ovaires.

Les ovariectomies et les prélèvements sanguins seront réalisées sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). L'ovariectomie entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et postopératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard si nécessaire).

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour :

Remplacer : les principes actifs sont en général testés *in vitro* au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme.

Réduire : pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisé est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. 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.

Raffiner : le raffinement passe par la réduction de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu. Les actes chirurgicaux et les traitements analgésiques seront réalisés par des expérimentateurs formés ce qui permet de réduire le traumatisme et le stress induit. Outre la gestion de l'analgésie, l'état général et clinique des animaux sera surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un porteur du projet pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière sera plus spécifiquement axée sur les douleurs occasionnées par les suites de l'acte chirurgical, les effets secondaires des traitements s'ils sont connus et sur le poids de l'animal (indice majeur de stress et de souffrance). L'évaluation journalière permettra la mise en place et l'ajustement de traitements analgésiques. Tout animal ayant atteint un ou plusieurs des points limites (repéré le plus précocement possible grâce à un suivi quotidien) sera euthanasié.

16689 La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative progressive qui est caractérisée par des altérations de la mémoire en relation avec des déficits de connexions entre les neurones dans l'hippocampe et le cortex préfrontal, deux zones cérébrales clés dans le traitement des différentes modalités mnésiques. La maladie est caractérisée aussi par des troubles des fonctions cognitives et de l'orientation dans le temps et l'espace. Le malade perd progressivement ses facultés cognitives ainsi que son autonomie. De nouvelles études scientifiques suggèrent que la démence, une perte de capacité mentale suffisamment grave pour affecter les activités normales de la vie quotidienne, serait liée à un dysfonctionnement des synapses, et donc des connexions entre les neurones.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les propriétés des circuits neuronaux impliqués dans cette pathologie neurodégénérative qui est la cause la plus fréquente de démence chez l'être humain. Il vise à terme à mieux comprendre les mécanismes qui permettent de réguler l'activité individuelle des neurones et l'activité intra-neurones.

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer: ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'identification de l'activité neuronale en condition normale nécessite l'utilisation d'un cerveau intact chez l'animal. Des méthodes *in vitro* telles que la culture cellulaire ou bien les coupes de cerveau ne contiennent pas les connexions neuronales qui sont le sujet de nos travaux. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

Réduire: le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de données permettant d'atteindre une signification statistique. Ce nombre est donc de 30 rats par groupe, soit un total de 120 rats pour la réalisation de ce protocole.

Raffiner: Afin de réduire au minimum la souffrance des animaux, les procédures suivantes seront utilisées: A leur arrivée, les animaux sont mis en cage par l'animalier qui effectue un premier contrôle de leur état de santé. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation, dans des cages collectives et bénéficient d'un enrichissement constitué d'une maison en carton ou de carrés de cellulose avec lesquels ils peuvent construire des nids. Pour assurer les bonnes conditions des électrodes implantées, à la suite de la chirurgie, les animaux sont placés en cages individuelles qui bénéficient également d'un enrichissement. La durée de l'isolement des animaux n'excède pas 2 mois. Les rats sont habitués à la manipulation; ils ne sont donc pas stressés en présence de l'homme et lors des manipulations. 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. Ainsi, nos mesures mises en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales impliquent une induction et suivi de l'anesthésie, une mise en place d'analgésie en pré et post-opération, une installation tout au long des procédures chirurgicales de contrôle de la température par tapis chauffant, avec un respect particulier de la notion de points limites adaptés à chaque procédure (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux).

16690 La lamproie de Planer est une des trois espèces de lamproies européennes, toutes protégées au titre de la directive habitat faune-flore. Elle vit dans de petits cours d'eau, où elle se déplace pour gagner ses sites de reproduction. Ces petits cours d'eau sont parfois fragmentés par des seuils (prise d'eau pour microcentrales électriques ou moulins) qui ne perturbent pas forcément la migration d'espèces emblématiques comme la truite ou le saumon, et ne sont donc qu'exceptionnellement aménagés pour le franchissement par les poissons. Mesurer l'impact de ces obstacles sur les déplacements des lamproies de Planer constitue un fort enjeu de conservation pour l'espèce. Ceci peut être fait grâce à un protocole de capture-marquage-recapture, où des individus capturés en aval de l'obstacle sont marqués (typiquement avec un transpondeur appelé PIT tag), puis tracés par des systèmes de détection à distance. Une expérimentation préliminaire en milieu contrôlé a déjà montré l'absence d'effet de l'implantation du PIT tag sur la survie et la condition de lamproies de Planer après 60 jours.

Le présent projet a pour objectif de mesurer en milieu naturel la franchissabilité par la lamproie de Planer d'un étang aménagé sur un petit cours d'eau. Cet étang est régulé par un seuil jugé problématique pour la migration piscicole, et qui fera l'objet de prochains travaux de restauration. Des aménagements spécifiques pour la lamproie ne seront réalisés que si l'espèce est capable de migrer en amont de l'étang pour rejoindre des sites de reproduction favorables. Le protocole mis en œuvre dans ce projet nécessite la capture de lamproies par pêches électriques puis l'implantation d'un transpondeur cylindrique (PIT tag) dans la cavité générale des lamproies de Planer adultes. Au total, 200 lamproies de Planer (adultes ou larves de grandes taille susceptibles de se métamorphoser) seront prélevées par pêche à l'électricité dans le cours d'eau en aval de l'étang. Elles seront anesthésiées, mesurées puis marquées par PIT tag. Le marquage se fera sous anesthésie par balnéation, en utilisant des instruments stériles. Le remplacement par un modèle de simulation ou par une autre espèce n'est pas envisageable car aucune autre espèce ne présente la même écologie, morphologie, ni capacité de nage que la lamproie, et il n'existe pas d'élevage de lamproie de Planer (règle des 3 R : Remplacement). L'effectif de 200 individus est le minimum nécessaire pour atteindre une représentativité suffisante du comportement migratoire à l'échelle de la population, tenant compte de la variabilité entre individus, sachant que l'effort de marquage sera réparti sur 2 années consécutives pour prendre en compte la variabilité des conditions environnementales (Règle des 3R : Réduction). Enfin, l'incidence du marquage sera minimisée en contrôlant en permanence la température de l'eau, le temps d'anesthésie et de réveil, et en réduisant au maximum le temps de manipulation (règle des 3R : Raffinement).

Les points limites sont définis sur la base d'observations du comportement de nage et de la couleur des lamproies, permettant de réagir rapidement à des signes d'inconfort exprimés par les animaux juste après marquage.

16691 Une personne sur quatre souffre de troubles mentaux. Les troubles mentaux regroupent un vaste ensemble de problèmes, dont les origines diffèrent. L'étiologie des troubles mentaux comporte des facteurs individuels (ex : génétique) et environnementaux. Ils se caractérisent généralement par une combinaison de pensées, d'émotions, de comportements et de rapports avec autrui anormaux. Les mécanismes biologiques sous-tendant ces troubles sont loin d'être élucidés mais une dérégulation des transmissions au glutamate, principale molécule véhiculant des informations excitatrices dans le cerveau, ou à l'acétylcholine, principale molécule modulatrice cérébrale, est souvent associée.

Deux procédures sont incluses dans ce projet et sont destinées à la formation d'apprenants dans le cadre des Travaux Pratiques (TP) axé sur le domaine des neurosciences. Ces procédures se déclinent

sous forme de séances de travaux pratiques (TP) d'une durée de 4 h chacune et seront encadrées par des personnes possédant les habilitations à expérimenter de niveau B.

Les objectifs de ces TP sont doubles :

(i) les initier à la complexité des analyses comportementales et l'interprétation des données nécessaires à la recherche s'intéressant aux troubles mentaux.

(ii) sensibiliser les étudiants à l'utilisation d'animaux de laboratoire en s'appuyant sur la règle des 3R et leur présenter le cadre légal pour une telle approche (notion d'éthique et à la réglementation en vigueur).

Pour ce faire, nous avons donc besoin d'un modèle animal. 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 mesures de comportements émotionnels tel que l'anxiété et compulsifs, et mnésiques sont facilement modélisables chez le rongeur. Nous utiliserons une approche pharmacologique reposant sur l'injection systémique d'un composé biologiquement actif permettant d'interférer avec la transmission au glutamate et à l'acétylcholine et nous étudierons son impact sur les niveaux d'anxiété, de compulsivité et les capacités mnésiques de l'animal.

Parce que l'étude des structures et circuits cérébraux contrôlant les réponses émotionnelles et compulsives ne peut se faire qu'à l'échelle de l'organisme entier, aucune méthode de remplacement ne peut s'appliquer ici. Dans un souci de réduction, les procédures sont réalisées en binômes et les prévisions statistiques permettent d'utiliser le moins d'animaux possibles en estimant la taille minimale nécessaire à chaque expérience. Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et contrôlé (enrichissement, température, nourriture, etc.). Les souris reçoivent une unique injection intrapéritonéale et les tests reposent sur l'observation de comportements d'exploration spontanée sans contrainte. La procédure est légère, n'induit aucune douleur hors de l'injection, et ne requiert ainsi l'utilisation d'aucun analgésique. Des points-limites précoces et adaptés à une procédure légère ont été établis afin surveiller le bien-être des animaux.

Afin de tenir compte de la nécessité de réduction, le nombre maximal utilisé dans ce projet est de 800 souris adultes pour une durée de 5 ans.

16692 Au cours de l'évolution, certaines espèces acquièrent de nouvelles formes, inédites chez leurs ancêtres. Puisque dans l'embryon, les réseaux génétiques contrôlent le développement des formes, ces espèces innovantes ont donc acquis des changements dans ces réseaux génétiques, qui sont responsables pour ce changement de forme. Mais quelle est la nature de ces changements?

Pour répondre à cette question, nous avons étudié les changements génétiques qui ont permis l'acquisition d'une nouvelle forme de molaire, pourvue de deux pointes supplémentaires, chez les ancêtres de la souris, alors que leurs cousins, comme le hamster aujourd'hui, conservaient le nombre de pointes ancestral. Le gène *Bmper* est le meilleur candidat issu de notre étude.

Pour comprendre si l'évolution de ce gène a joué un rôle dans l'acquisition de ces deux pointes supplémentaires au cours de l'évolution, nous étudierons le phénotype dentaire d'une souris où le gène *bmper* a été invalidé. Si il a joué un rôle, alors nous nous attendons à ce que les pointes supplémentaires soient absentes (ou tout du moins réduites en taille), dans ces individus, ramenant (ou rapprochant) la morphologie à l'état ancestral.

Le mutant *bmper* est déjà caractérisé chez la souris. Les adultes porteurs de la mutation sont en bonne santé, mais les nouveaux nés ayant reçu la mutation de leurs deux parents meurent rapidement après la naissance d'une insuffisance respiratoire. Ceci nous empêche d'avoir accès à la morphologie dentaire chez l'adulte, et pose le problème de la souffrance de ces foetus.

Pour contourner ces problèmes, il s'agira donc de mettre à mort les foetus la veille de la naissance pour les soumettre à une radiologie 3D (microCTscann) permettant de reconstituer la forme de la dent en 3D, bien qu'elle ne soit que partiellement minéralisée à ce stade. Nous pourrions ainsi déterminer la présence/absence/réduction des pointes supplémentaires, et obtenir un argument majeur contre/en faveur de l'implication du gène dans cette innovation évolutive.

Comme les deux pointes supplémentaires se forment et croissent guère avant la naissance, elles pourraient être encore petites chez le sauvage, et invisibles chez le mutant. Nous voudrions alors faire la différence entre un retard de croissance chez le mutant, et une véritable absence. Dans ce cas, nous étudierions aussi des foetus dans les jours qui précèdent la naissance pour déterminer la présence/absence d'expression de marqueurs moléculaires qui préfigurent la croissance des pointes. Leur absence nous assurera que même si nous avons pu laisser grandir les foetus mutants, ils n'auraient jamais développé les pointes supplémentaires.

Nous ne savons pas prédire l'effet du gène sur la morphologie dentaire par modélisation informatique, et nous ne savons pas produire *in vitro* des dents qui aient une morphologie ressemblante à celle de la dent qui se forme dans la mâchoire. Le recours à l'invalidation *in vivo* et donc à des animaux est donc indispensable pour vérifier l'effet du gène *bmp4* sur la morphologie dentaire.

Pour limiter la souffrance, nous éviterons le moment problématique de la naissance où il y a mort des nouveaux nés par asphyxie. A la place, nous mettrons à mort des foetus de souris après anesthésie. Nous apporterons aussi une surveillance intense de la fin des gestations pour prévenir toute naissance anticipée. Enfin, nous limiterons le nombre de ces "gestations à risque" de façon à obtenir les 38 foetus mutants nécessaires et suffisants pour atteindre une conclusion définitive.

16693 L'anxiété est une réponse psychologique et physiologique à une menace future. C'est une réaction normale à de nombreux types d'événements et de situations dans notre vie quotidienne et un de nos systèmes internes d'alerte pour la survie. Les troubles anxieux surviennent lorsque l'anxiété reste constamment excessive en l'absence de toute menace potentielle. Cette pathologie constitue la condition psychiatrique possédant la plus forte prévalence. Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2007, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes en France présentent des troubles d'anxiété généralisés. L'anxiété représente ainsi un coût sociétal et économique majeur.

Une hypothèse propose que des dysfonctionnements des circuits de la peur, et les circuits impliqués dans l'encodage de la valence sont à l'origine de l'anxiété pathologique. Le cortex insulaire est une région cérébrale spécifique pour laquelle son implication dans les troubles anxieux chez l'humain a été montrée. Toutefois, les circuits et microcircuits neuronaux de cette région, ainsi que les comportements motivés par les émotions, et l'implication de cette région dans l'anxiété, n'ont été que très peu étudiés jusqu'à présent.

Ce projet a pour but d'étudier les circuits d'interneurones, une population clé de neurones du cortex insulaire, et l'implication de ces différents types d'interneurones dans le traitement de l'information émotionnelle au sein du cortex insulaire, dans un modèle d'anxiété chez la souris, grâce à l'analyse anatomique et de la connectivité, de manipulations et d'enregistrements de l'activité neuronale.

Par ailleurs, ce projet vise également à cartographier les relations et connexions des interneurones du cerveau intégral, permettant la compréhension ultérieure de l'intégration des différents types d'interneurones dans le réseau neural émotionnel du cerveau entier.

De manière plus globale, ce projet s'inscrit dans la mise évidence des altérations du fonctionnement de circuits neuronaux contrôlant le niveau d'anxiété, afin de pouvoir envisager des stratégies de restauration de ces altérations chez les patients atteints de troubles anxieux.

Remplacer : Le projet porte sur une analyse de la connexion des neurones et de leurs propriétés de transmission d'informations au cours du comportement. Par conséquent cette procédure doit être effectuée chez des animaux vivants. Des méthodes telles que la culture cellulaire ne permettent pas la quantification des connexions neuronales ou la mesure de l'activité en réponse à une stimulation sensorielle *in vivo*.

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux afin d'obtenir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques) et complète de la connectivité et de l'activité de la région cérébrale d'étude. Nous utiliserons ainsi 2040 animaux sur cinq ans.

Raffiner : Les animaux seront hébergés en cages collectives enrichies en nids de coton, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les animaliers tout au long de leur vie, et bénéficieront d'une surveillance plus particulière par les expérimentateurs en période expérimentale. Tout au long de la période expérimentale, les animaux seront pesés quotidiennement

afin de vérifier leur capacité à s'alimenter, et leur état général (état du pelage, sociabilité, posture...) sera inspecté. Les éventuelles agressions entre congénères seront stoppées par l'isolement de l'agresseur, et la victime sera soignée (désinfection des plaies, aide à la cicatrisation). Une prémédication pré-chirurgicale sera systématique afin d'éviter la souffrance post-opératoire. Des points limites suffisamment prédictifs sont mis en place pour éviter la souffrance tout au long de la vie de l'animal.

16694 Avec plus de 650 millions de personnes touchées dans le monde en 2016, l'obésité est devenue un problème de santé majeur. Les patients obèses 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, suivie très souvent d'un retour rapide au poids initial à la fin de ces interventions, le soi-disant « effet yo-yo ». Afin de considérer de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux comprendre les processus biologiques responsables de cette pathologie. Le cerveau, et en particulier une région appelée l'hypothalamus, joue un rôle majeur dans la régulation de notre poids corporel. Un groupe de neurones de l'hypothalamus, appelés neurones à pro-opiomélanocortine (POMC), présentent une activité altérée chez les patients obèses ou diabétiques, et une telle altération contribue à la progression de ces pathologies. Cependant, les facteurs moléculaires majeurs entraînant un tel déficit neuronal ne sont pas encore bien compris.

Une protéine récemment mise en évidence, appelée Tbx3, joue un rôle majeur dans le contrôle de la machinerie fonctionnelle normale des neurones à POMC, et des mutations de cette protéine pourraient expliquer pourquoi ces neurones ne fonctionnent pas normalement chez les patients obèses. Cependant, les signaux exacts régulés par cette protéine au niveau des neurones à POMC restent à mettre en évidence.

L'objectif de notre projet est d'identifier les facteurs moléculaires majeurs contrôlés par Tbx3 dans les neurones à POMC. Répondre à cette question nous permettrait de dévoiler de nouveaux gènes impliqués dans la progression de l'obésité et des conséquences sur la santé qui y sont associées. Notre recherche pourrait alors représenter une première étape dans la mise en place de nouvelles substances pharmaceutiques capables de cibler ces facteurs et donc l'activité des neurones à POMC dans le but de prodiguer des effets thérapeutiques bénéfiques à ces patients.

Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons un maximum de 496 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.

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.

16695 Pour les patients atteints de thrombopénie ou thrombocytopénie (diminution du nombre de plaquettes sanguines), les composants plaquettaires sont des produits thérapeutiques pour lesquels il n'existe pas de substitut. Cependant, les complications transfusionnelles sont plus fréquentes avec ce produit sanguin labile. Cela est dû aux produits sécrétés par les plaquettes elles-mêmes. Notamment divers cytokines, chimiokines et modificateurs de réponse biologique, dont certains sont sécrétés en grande quantité après activation plaquettaire. Les raisons pour lesquelles les plaquettes sont activées 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, le processus de préparation et de préservation des plaquettes.

Le TRALI (transfusion-related acute lung injury) est un syndrome de détresse respiratoire aigu post transfusionnel. Il survient dans les 6 heures suivant la transfusion d'un produit sanguin, comme les composants plaquettaires, et se présente comme un œdème pulmonaire aigu. Sa pathogénie fait encore l'objet de controverses et met en cause un conflit immunologique et/ou la présence de molécules solubles plaquettaires, entre le donneur et le receveur. Ce protocole vise à explorer des réponses muqueuses et systémiques, chez la souris, en lien avec le rôle inflammatoire des plaquettes sanguines. Notre objectif final est d'améliorer les processus de préparation des composants plaquettaires et diminuer les complications transfusionnelles dont les cause seront explorées en modèle murin.

Pour ce faire, nous évaluerons le rôle des plaquettes dans l'interaction physique des lymphocytes T avec les autres cellules du système immunitaire. Ce projet portera donc sur 252 souris. Ce nombre de souris est justifié par l'étude de plusieurs conditions expérimentales. Plusieurs groupes de souris sont ainsi définis soit 14 groupes de 6 souris permettant l'investigation de deux types de lymphocytes T, les CD4+ et les CD8+ et 3 molécules d'intérêt qui caractérisent l'interaction cellule-cellule entre les T et les autres cellules du système immunitaire. Nous souhaitons corroborer les résultats lors de trois expériences indépendantes ce qui explique le nombre d'animaux.

Pour résumer

-14 conditions

-6 animaux

(14X6X3=252).

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 d'une analyse de la littérature scientifique nous permettant l'identification des cibles d'intérêt. Ainsi, nous avons pu sélectionner 2 types cellulaires et 3 molécules. Les différents prélèvements sanguins et muqueux et la mise à mort des animaux s'effectueront sous anesthésie générale.

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 géré grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2) ; 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.

16696 La transplantation rénale est le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale tandis que la transplantation hépatique, cardiaque et pulmonaire est le seul traitement de l'insuffisance terminale du foie, du cœur et du poumon, respectivement. La transplantation d'organe a permis de sauver la vie de centaines de milliers de patients dans le monde, cependant elle nécessite un traitement

à vie par des immunosuppresseurs qui sont associés à beaucoup de complications comme les infections, les cancers et les maladies cardiovasculaires, rénales et métaboliques. De plus, l'organe greffé est perçu comme non-soi, déclenchant un processus de rejet soit précoce (rejet aigu), soit à long-terme (rejet chronique) médié par les lymphocytes T (rejet cellulaire) et/ou les anticorps anti-donneur (rejet humoral), entraînant la perte du greffon. Par conséquent, il est nécessaire de chercher de nouveaux médicaments ou de nouvelles approches thérapeutiques qui sont à la fois efficaces pour lutter contre le processus de rejet et moins toxiques pour limiter les complications liées aux traitements. Dans cette optique, les modèles d'allogreffe chez la souris et le rat sont indispensables pour tester de nouvelles molécules afin de fournir une première preuve de concept préclinique de leur efficacité en transplantation, ce qui pourra servir comme base à la poursuite du développement de ces molécules. Aucun test *in vitro* ne peut remplacer ces expériences *in vivo*.

Nous utiliserons trois modèles d'allogreffe chez la souris : greffe de peau, greffe d'îlots pancréatiques et greffe de moelle osseuse et un modèle de greffe de cœur chez le rat. Ce sont des modèles bien établis et utilisés par notre centre de recherche aboutissant à plusieurs publications scientifiques. De plus, des candidats médicaments issus de nos recherches utilisant ces modèles sont en train d'être développés et seront testés chez l'homme. Dans ce projet, nous testerons l'effet des anticorps dirigés contre les cytokines ou contre les récepteurs de cytokines, seul ou en combinaison, dans la prolongation de la survie du greffon et l'induction de la tolérance en utilisant ces modèles. Les voies de signalisation de ces cytokines sont très importantes dans la réponse immunitaire et sont devenues des cibles thérapeutiques dans les maladies autoimmunes et la transplantation. Vu la complexité des mécanismes et le nombre d'anticorps et de combinaisons thérapeutiques à tester, nous avons prévu d'utiliser environ 140 souris et 20 rats par an pendant la durée prévue du projet (5 ans), soit 700 souris et 100 rats au total. Nous essayerons de réduire le nombre total d'animaux utilisés si possible, dès que l'objectif sera atteint.

La règle 3R sera appliquée de façon suivante :

Réduire : le nombre d'animaux retenus a été calculé afin de permettre d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Chaque modèle sera choisi en fonction des mécanismes d'action prévus de chaque molécule ou combinaison de molécules afin de pouvoir obtenir des résultats reproductifs avec moins de variabilité.

Remplacer : l'utilisation de ces modèles animaux est justifiée par l'absence de systèmes *in vitro* alternatifs permettant de prévoir l'effet d'un candidat médicament chez l'homme dans le cadre d'un processus complexe comme la transplantation d'organe. Cependant, les dosages et les combinaisons de traitement à tester *in vivo* seront guidés par des tests *in vitro* préalables.

Raffiner : des mesures antalgiques adaptées à chaque procédure d'expérimentation seront mises en œuvre afin de limiter la souffrance des animaux. Les animaux seront suivis régulièrement, l'expérimentation sera arrêtée lorsque le rejet ou la tolérance à long-terme du greffon (plus de 120 jours après l'arrêt du traitement) soit confirmée.

16697 Le glioblastome (GB) est la forme la plus fréquente et la plus agressive des tumeurs cérébrales. En raison d'une absence de thérapie curative, la médiane de survie reste de 15 mois malgré le traitement conventionnel associant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie adjuvante.

Dans notre laboratoire, focalisé sur le développement de nouveaux traitements locorégionaux, l'intérêt d'une radiothérapie interne nanovectorisée utilisant des nanocapsules de Rhénium 188 (¹⁸⁸Re) a été démontré. Cette méthode permet d'irradier localement la tumeur, en minimisant les effets sur les organes voisins du site tumoral. Un second axe développé dans l'équipe concerne le développement d'un bio-implant polymère pour le piégeage tumoral. Ce système doit être implanté au sein de cavités d'exérèse dans le but d'attirer et de confiner les cellules tumorales résiduelles (présentes au sein des marges) en amont de leur élimination. Cette initiative pose la question de l'efficacité du piégeage et du confinement sur l'expansion tumorale. Elle pose également celle de l'élimination des cellules piégées, faisant alors lien avec notre première stratégie d'utilisation de la radiothérapie. La synergie entre piégeage et radiothérapie vectorisée sera donc testée.

Ce projet sera développé chez le rat, permettant des gradients d'infusion de chimio-attractant et des migrations cellulaires sur des volumes et distances plus importants que chez la souris. La possibilité d'utiliser deux types cellulaires dans deux types de rats est envisagée afin d'investiguer les réponses dans un cadre de xénogreffe d'une part et dans un cadre syngénique d'autre part (permettant d'étudier le rôle de l'immunité). En effet, nous avons validé l'importance de la voie de signalisation SDF1alpha/CXCR4 dans les réponses aux radiations à partir de cellules humaines sur-exprimant le récepteur CXCR4 et la Red Fluorescent Protein (RFP) (cellules de niveau sécuritaire 1). Ce modèle sera utilisé chez le rat nude. Par ailleurs la lignée cellulaire F98 (modèle de GB de rat) sera utilisée chez le rat Fischer pour les études syngéniques.

PLAN DE CONTINGENCE : Pour des raisons de réponses *in vivo* à l'agent chimio-attractant initialement choisi, alternativement le modèle RG2 (cellules de rat exprimant constitutivement le CXCR4, récepteur au SDF1alpha) pourra également être utilisé chez le rat Fischer.

Les livrables de ce projet d'expérimentation animale sont :

- La validation des modèles de résection intracavitaire en orthotopique (cellules U87MG CXCR4+ chez le rat nude et F98 chez le rat Fischer)
- L'évaluation préclinique *in vivo* de bio-implants polymères : éponges (eg. Fibroïne de soie, acide hyaluronique) libérant SDF1alpha, nanofibres électrospinnées (fibroïne de soie, chitosane) intégrant des nanoparticules polymères chargées en SDF1alpha.
- Base de données sur l'efficacité préclinique des implants polymères types « pièges à tumeur » chez le rat nude et chez le rat Fischer.
- Base de données sur les modalités d'application des implants polymères types « pièges à tumeur » permettant de relier leur impact biologique (signaux) en lien avec leur efficacité.
- Base de données sur l'impact synergique avec la radiothérapie locorégionale en vue d'une utilisation clinique.

Remplacer : Ce projet a déjà fait l'objet d'études *in vitro* ayant abouti à plusieurs publications. Sa mise en place nécessite désormais l'utilisation d'animaux pour valider les étapes de piégeage et d'élimination des cellules tumorales. L'utilisation de deux modèles est indispensable pour obtenir des données interprétables, par la suite valorisables par la publication et transférables en clinique. Pour mener à bien ce projet, de nombreux paramètres seront étudiés au préalable via des modèles cellulaires pour limiter l'utilisation d'animaux (effets des bio-implants et des radiopharmaceutiques sur la prolifération, la motilité, l'invasion, l'induction de la mort cellulaire ou encore le comportement des cellules immunocompétentes).

Réduire : Les groupes d'animaux ont été constitués dans le but d'obtenir des données valables statistiquement. Une marge de manœuvre a été prise en compte afin de conserver cette significativité en cas de perte d'un ou plusieurs animaux et d'éviter de répéter l'expérimentation avec un groupe complet. Pour les données échantillonnées (prélèvements et coupes : immunohistochimie, cytométrie, RTqPCR, RNAseq), des tests statistiques seront effectués à l'aide d'une analyse de variance à un ou deux facteurs (ANOVA). La significativité statistique des expériences de point limite sera déterminée à l'aide du test du log-rank.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans un environnement dont la température, l'humidité, le renouvellement de l'air ainsi que le cycle d'éclairage (12h de lumière, 12h d'obscurité) sont contrôlés selon les normes légales en vigueur. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale avec un mélange kétamine (100mg/kg) / xylazine (13mg/kg) en intrapéritonéale. Les animaux seront également traités avec un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) 3 jours avant l'opération et en post-opératoire pendant 4 jours : kétoprofène à 5mg/kg, disposé dans l'eau de boisson. Une anesthésie gazeuse sera appliquée aux animaux lors du suivi IRM hebdomadaire : induction sous isoflurane 5% puis maintient à 2%. L'euthanasie des animaux sera réalisée par inhalation létale par gradient progressif de CO₂.

Total : 300 rats nudes, 300 rat Fischer pour 5 ans.

16698 Le projet se place dans un contexte clinique de traitement de tumeurs cérébrales très agressives (glioblastomes) qui, selon leur localisation, peuvent ne pas être opérables. La radiothérapie conventionnelle est actuellement un traitement de référence dans de nombreux cancers. Dans le cas des glioblastomes, la combinaison de la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ne présente qu'une efficacité limitée du fait d'un taux de récurrences très élevé et le taux de survie très faible. Ce projet préliminaire exploratoire se place dans un contexte de développement de nano-objets qui peuvent réduire la toxicité de la radiothérapie et augmenter son efficacité en la combinant avec la thérapie photodynamique (PDT). La thérapie photodynamique est un traitement qui utilise des médicaments non toxiques à l'obscurité (appelés agents photosensibilisants ou photosensibilisateurs) en combinaison avec la lumière et l'oxygène pour tuer les cellules cancéreuses. La finalité de ce projet est de proposer une nouvelle modalité de traitement associant deux thérapies (thérapie bimodale) en couplant les rayons à haute énergie (rayons X utilisés dans le cas de la radiothérapie) à la PDT : la radio-PDT. Il s'agit d'une prise en charge nouvelle et non chirurgicale par rayonnement. Le concept général relève d'un nano-objet composé de deux principes actifs activables par transfert d'énergie : agent scintillateur aux propriétés radiosensibilisantes et/ou de contraste pour l'imagerie-agent photosensibilisant. Ce projet d'étude exploratoire *in vivo* (expériences réalisées sur les tumeurs implantées dans le cerveau des souris) vise à valider l'association des deux thérapies (transfert d'énergie). Ce projet fait suite à l'étude ayant montré l'efficacité *in vitro* sur une lignée cellulaire de glioblastome adulte. Le but de ce projet est de valider le concept de radio-PDT par mesures de bioluminescence des tumeurs traitées par radiothérapie seule ou par radio-PDT et analyse de survie des souris. Pour cela, trois procédures seront nécessaires. Les tumeurs seront implantées dans le cerveau des souris. Puis, les nanoparticules testées seront injectées quelques heures avant traitement de radiothérapie. Enfin, les souris seront imagées régulièrement tout au long de leur survie afin d'évaluer l'effet des traitements sur la croissance tumorale et la survie générale des animaux. Cette étude nécessitera 30 souris nude.

L'étude est réalisée dans le but de respecter la règle des trois R. Afin de contribuer au REMPLACEMENT nous essayons autant que possible de développer des méthodes alternatives par l'étude *in vitro*. Mais du fait de notre thème de recherche, la cancérologie, nous sommes contraints de développer des modèles animaux permettant de se mettre dans des conditions environnementales tumorales le plus proche possible de celles rencontrées chez l'être humain. Le suivi longitudinal par imagerie des animaux permet la REDUCTION du nombre d'animaux utilisés. Enfin, en conformité avec le RAFFINEMENT le bien-être des animaux sera évalué par un suivi quotidien (poids et comportement général des souris). Les souris seront anesthésiées pour toutes procédures stressantes et/ou douloureuses. La mise à mort sera effectuée dès lors que l'un des points limites sera atteint (perte de poids de plus de 20% par rapport au poids avant greffe s'étalant sur plus de trois jours ou état général et comportement affectés).

16699 Ce projet s'inscrit dans un ensemble de travaux visant à comprendre le rôle de la chromatine dans l'établissement et le maintien des rythmes circadiens. Les horloges circadiennes sont des oscillateurs omniprésents permettant aux animaux d'adapter et de coordonner leur physiologie intrinsèque aux changements environnementaux. L'implication de dysfonctionnements de l'horloge circadienne dans certaines maladies ou syndromes comme les troubles du sommeil, la dépression, l'obésité ou la susceptibilité à certains cancers a également été démontrée. Dans la plupart des tissus mammifères, les horloges contrôlent de façon spatiotemporelle des événements transcriptionnels tout en préservant la plasticité du génome. En plus des facteurs de transcription de l'horloge, de nombreuses protéines de remodelage de la chromatine et des phénomènes épigénétiques ont récemment été impliquées dans l'expression rythmique des gènes et le fonctionnement de l'horloge.

Des études préliminaires ont montré qu'un facteur épigénétique essentiel, un variant d'histone de H2A, régule l'horloge dans les tissus périphériques murins. L'objectif de cette demande est maintenant de caractériser le rôle de ces protéines dans les horloges périphériques du foie, pendant le développement de la fibrose hépatique et les complications ultérieures, en combinant approches génétiques chez la souris, comportementales et analyses à grande échelle du génome.

Cette étude contribuera à faire progresser la compréhension du rôle des mécanismes épigénétiques dans le contrôle des horloges périphériques pendant le développement de la stéatose hépatique et du cancer du foie. Elle repose sur l'analyse par imagerie de bioluminescence de lignées rapportrices de variants d'histones dans différents contextes : sous différents régimes alimentaires et différentes conditions de Jet-Lag. Aucune souffrance animale n'est attendue lors de ces procédures.

Comme la complexité de l'environnement tissulaire et le réseau complexe des mécanismes impliqués ne peuvent pas être reproduits *in vitro*, cette étude nécessite la réalisation d'expériences dans un environnement intégral, à l'échelle de l'animal. En parallèle, des études *in vitro* sont réalisées pour aborder les interactions et les voies de signalisation moléculaires impliquées.

Pour les études *in vivo*, nous travaillons avec le modèle souris car c'est actuellement la seule espèce chez laquelle il existe des modèles de variants d'histones, lesquels sont identiques entre l'homme et la souris et des modèles rapporteurs du rythme circadien. Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, les animaux seront produits à minima, sans compromettre les objectifs du projet et tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Les souris seront observées chaque jour. Des points limites d'interruption de l'expérience ont été définis. Des anesthésiques et des antalgiques seront utilisés en fonction des procédures afin de réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Les conditions d'hébergement et de soins utilisées et des points limites adaptés associés à des procédures de surveillance des animaux seront appliquées dans le respect^[SEP] du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. Ce projet concernera au maximum 216 souris.

16700 La variante de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (v-MCJ) est due à la transmission de l'agent de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), ou maladie de la vache folle à l'Homme, très vraisemblablement par voie orale. Malgré la mise en place de mesure de protection de la population, le risque de santé publique lié aux prions demeure, notamment en raison du risque de transmission secondaire inter-humaine de la v-MCJ par les produits sanguins.

En effet, quatre cas de contamination par l'agent de la v-MCJ, probablement liés à une transmission secondaire par transfusion sanguine, ont été rapportés au Royaume-Uni depuis 2003, ces patients ayant reçu des dons issus de donneurs en cours d'incubation de la v-MCJ et ayant développé la maladie par la suite. Par ailleurs de récentes observations suggèrent également une infection chez un patient hémophile ayant reçu des dérivés plasmatiques issus d'un prélèvement contaminé. En France, aucune contamination par transfusion n'a été rapportée, mais le risque transfusionnel existe également puisque trois parmi les 27 patients français ayant développé une v-MCJ étaient donneurs réguliers de sang. Des études réalisées sur des appendices prélevés lors d'intervention chirurgicale suggèrent une prévalence de porteurs asymptomatiques de 1/2000 en Grande-Bretagne (a priori 1/20.000 en France par extrapolation, puisqu'on estime que la population française a été soumise à une exposition à l'agent de l'ESB 10 fois inférieure à celle de la population britannique), ce qui correspondrait à environ 1.000 dons du sang à risque chaque année.

Le modèle d'infection expérimentale de macaque cynomolgus par l'agent de l'ESB ou de la vMCJ induit une pathologie similaire des points de vue clinique, lésionnel et biochimique à ce qui est observé chez l'Homme. L'ensemble de la communauté prion considère ce modèle comme un des plus pertinents pour l'évaluation des risques pour l'Homme.

Actuellement, l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde pour considérer les études *in vivo* comme les techniques de référence pour étudier le caractère infectieux des prions. Ces techniques *in vitro* ne sont a priori envisageables en méthodes alternatives qu'à moyen ou à long terme (minimum 5 à 10 ans). Il n'y a pas à ce jour de modèle *in vitro* alternatif, acellulaire ou cellulaire, qui soit capable d'évaluer le risque transfusionnel.

L'objet de la présente étude est d'évaluer le risque prion lié à la transfusion en utilisant un modèle de macaque cynomolgus (88 animaux au total), qui permettra de définir les paramètres influençant la charge infectieuse (nature de la fraction sanguine - plasma, leucocytes, sang total -, volume d'injection, statut du donneur) afin de déterminer ou de développer un système de surveillance pour l'Homme ?? . Ces études sont réalisées pour mimer la transfusion sanguine humaine (1 donneur - 1 receveur). Les

incubations des maladies à prions étant très longues au regard de l'espérance de vie de l'espèce considérée (jusqu'à 50 ans chez l'Homme), ces études nécessitent une surveillance des animaux sur plusieurs années. Des mesures compensatoires d'enrichissement sont mises en place avec la structure de bien-être animal afin de pallier à ces longues périodes d'expérimentation indispensables, ainsi qu'une mise en place de points limites.

16701 Le cancer de la peau de type non-mélanome est la forme de cancer la plus répandue dans le monde et particulièrement chez les populations adultes à peau claire. Le développement de nouvelles stratégies pour lutter contre l'apparition de ce cancer non mélanome reste un enjeu sociétal mondial, le nombre de cas détectés par an étant en constante augmentation. Parmi les facteurs de risques majeurs impliqués dans le développement de ce cancer, on retrouve les rayons ultraviolets (UV) et l'infection par les papillomavirus humains cutanés (HPV). De plus, les personnes immunodéprimées sont très sensibles à ce type de cancer de la peau, soulignant l'importance du système immunitaire dans la protection contre ce type de cancer.

Cette étude a pour but d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes synergiques de ces deux facteurs environnementaux, l'irradiation UV et l'expression de E6/E7 (qui sont les protéines impliquées dans la transformation par le virus HPV), dans le développement de la carcinogenèse de la peau. Pour cela nous utiliserons un modèle de souris transgéniques (Tg) exprimant de manière constitutive les onco-protéines E6 et E7 du virus HPV et nous étudierons : les réponses du système immunitaire avant et après exposition aux UVs. En particulier nous étudierons : 1-l'impact de E6/E7 et des UVs sur la voie de l'inflammasome (immunité innée) et son rôle dans la carcinogénèse de la peau ; 2- les différentes populations immunitaires (et leur niveau d'activation) recrutées au site exposé aux UVs. Il est prévu que les résultats obtenus faciliteront l'élaboration de stratégies préventives et / ou thérapeutiques contre le cancer non mélanome.

Le projet nécessitera l'utilisation de 2016 souris. Le choix du modèle souris est imposé par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés. De plus, la réponse immunitaire 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*. Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats des diverses expériences. 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.

16702 Le contrôle de l'équilibre prolifération/différenciation des cellules souches, ou progéniteurs neuraux, est essentiel au développement et à l'homéostasie du système nerveux. Une dérégulation de cet équilibre est associée à des défauts développementaux comme les microcéphalies ou peut être à l'origine de tumeurs. La caractérisation des acteurs moléculaires contrôlant cet équilibre en situation physiologique est un enjeu majeur en recherche fondamentale pour pouvoir identifier des marqueurs qui sont dérégulés dans les pathologies et conduire à long terme à la mise en place de nouvelles pistes thérapeutiques. L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle d'un régulateur du cycle cellulaire, la phosphatase CDC25B, dans le contrôle de cet équilibre lors de la formation du cortex cérébral chez les mammifères.

Nous utilisons des lignées existantes de souris génétiquement modifiées pour le gène CDC25B ou des lignes exprimant la CRE recombinase et une lignée C57bl/6. Ces lignées sont maintenues dans l'animalerie (hébergement et élevage). Nos expériences sont réalisées sur des embryons obtenus par croisement de ces différentes lignées. Nous caractérisons le phénotype des mutants à différents stades de production neuronale en analysant principalement les paramètres du cycle cellulaire et la production des différents types de progéniteurs et de neurones. Pour chaque expérience, nous analysons au moins 3 portées de façon à obtenir au moins 5 embryons de chaque génotype pour réaliser des analyses statistiques fiables. Ce projet comprend des expériences d'injection d'intercalant à l'ADN (BrdU et EDU), des traitements par des drogues modifiant les paramètres du cycle cellulaire (modification de la longueur des phases G1 et G2) et des expériences d'électroporation *in utero*.

Aucune des procédures réalisées n'entraîne de douleur ou de souffrance. Le projet nécessite l'utilisation de 298 animaux.

Remplacement : Ce projet suppose l'intégrité de l'organe durant toute la durée de l'expérimentation, c'est pourquoi il doit être réalisé sur un modèle vivant.

Reduction : Il nous faut un nombre suffisant d'embryons pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement fiables. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous concentrerons nos analyses sur 3 stades clés du développement du néocortex. La majorité des échantillons seront inclus en paraffine ce qui nous permet de collecter un grand nombre de coupes et de limiter le nombre d'embryons à collecter. Enfin, nous avons développé un test statistique prenant en compte la variabilité inter-portées et inter-individu ce qui nous permet de limiter le nombre d'embryons nécessaires à nos analyses.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement, dans des locaux conformes à la réglementation et suivis par un personnel spécifiquement formé afin que les besoins physiologiques des animaux soient respectés. L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité, stress) sera suivi quotidiennement.

16703 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 comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD).

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 4 modèles murins de la DMD ainsi qu'une souche de souris et de rats contrôles. Ce projet de recherche d'une durée de 5 ans requiert l'utilisation de 1000 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. Ce projet de recherche translationnelle vise à développer des candidats cliniques pour le traitement de la DMD 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*.

16704 Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement de maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

Le but de ce projet est d'étudier l'impact d'une déficience en IL34 (interleukine-34), une cytokine au rôle régulateur des réponses immunes, dans un modèle de colite aigüe médiée par le dextran sulfate sodium (DSS). Des rats déficients en IL34 ont été générés et montrent des déficits dans le contrôle de réponses immunes confirmant l'importance du rôle de l'IL34 dans la régulation de l'inflammation. L'IL34 partage avec le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) le même récepteur et ont des fonctions communes. L'ingestion de dextran sulfate sodium via l'eau de boisson induit une pathologie mimant les symptômes auto-immuns d'une colite avec lésions intestinales. Ainsi, étudier le développement de la colite chez les rats déficients en IL34 en comparaison à des rats WT (Wild-Type) permettra d'étudier l'impact de la déficience en IL34 sur les réponses immunes dans un modèle de maladie auto-immune.

Le nombre maximum d'animaux utilisés sera de : 77

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

-Remplacer: des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro*, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence de 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. Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le nombre total d'animaux est de 77 pour l'ensemble du projet

-Raffiner: les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement seront euthanasiés. Les résultats obtenus sur tous les animaux seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post-mortem, au niveau anatomopathologiques des tissus. De plus, des objets d'enrichissement sont placés dans les cages afin de limiter l'angoisse des animaux.

16705 Le monde entier rencontre actuellement l'explosion d'une épidémie d'un nouveau bêta-coronavirus connu sous le nom de « syndrome respiratoire aigu sévère Corona Virus 2 (SRAS-CoV-2).

Le SRAS-CoV-2 peut progresser et évoluer vers une maladie respiratoire aiguë sévère (SARI) et dans certains cas vers le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA).

Ce nouveau coronavirus est apparu en décembre 2019 à Wuhan, en Chine. Il s'agit d'un nouveau coronavirus qui n'avait pas encore été identifié chez l'homme. Il s'est rapidement propagé dans 190 pays et territoires à travers le monde et est devenu une urgence de santé publique de portée internationale par l'OMS.

La maladie associée à ce virus est appelée COVID19, pour « coronavirus disease 2019 ». En France, on dénombre actuellement 15 821 cas de COVID 19 et 674 décès.

Les décès dus au COVID-19 ont été causés par un syndrome de dysfonctionnement d'organes multiples et pourraient être attribuables à une large distribution dans différents organes de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2), qui est le récepteur fonctionnel du SRAS-CoV-2. L'importante propagation du virus, l'augmentation des nombres de cas aggravés conduisant à des décès montrent l'importance de l'étude de traitements pour diminuer la charge virale du SRAS-CoV-2 et ainsi réduire les complications associés au COVID19.

D'après des données publiées, le SARS-CoV-2 peut être traité à large échelle par de l'hydroxychloroquine (inhibiteur de la réplication des virus enveloppés) avec de l'azithromycine (antibiotique contre les infections pulmonaires).

En raison de leur état immunosupprime systémique causé par les tumeurs malignes et les traitements anti-cancéreux, les patients atteints de cancer présenteraient un risque accru d'avoir le COVID-19 et auraient un pronostic et des résultats moins bons lors d'une maladie COVID-19.

L'importance de la propagation de ce virus SARS-CoV-2, les risques associés, la fragilité des patients avec cancer, il est vital d'établir si le traitement proposé hydroxychloroquine avec azithromycine peut être associés aux traitements anti-cancéreux de la chimiothérapie (ex: oxaliplatine) et de l'immunothérapie (ex: blocage de PD-1).

Dans notre étude, nous souhaitons tester la combinaison hydroxychloroquine et Azithromycine sur des souris porteuses de sarcomes, de tumeur du rein ou de tumeur du poumon en association avec des traitements anti-cancéreux. 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* avant l'utilisation à plus grande échelle sur l'Homme.

Ce projet nécessitera 720 souris. Ce nombre d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques 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. 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 dépendamment des gestes techniques. Les animaux bénéficieront d'enrichissements variés.

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 et statistiquement plus puissant, ce qui contribue aussi à la réduction du nombre d'animaux utilisés).

16706 Comprendre les mécanismes qui déterminent le destin et la spécialisation des cellules au cours du développement est une question fondamentale, qui a des répercussions immédiates sur notre compréhension de l'origine des maladies congénitales et des cancers. Dans ce contexte, nous nous intéressons au rôle de la méthylation de l'ADN, une modification biochimique naturelle de l'ADN. En influençant l'expression des gènes sans en modifier leur séquence, la méthylation de l'ADN est intimement liée à l'établissement et la consolidation de l'identité des cellules, selon un mode de régulation dit « épigénétique ».

Les profils de méthylation de l'ADN sont très dynamiques au cours du développement embryonnaire précoce, alors que les cellules embryonnaires subissent des changements drastiques d'identité. Juste après la fécondation, l'embryon nouvellement formé perd d'abord massivement les profils de méthylation de l'ADN dont il a hérité du spermatozoïde et de l'ovule. Cette phase s'accompagne d'une relaxation de l'identité, comme la fonction « reboot » d'un ordinateur, qui donne un statut de pluripotence à l'embryon, c'est-à-dire la capacité de former tous les tissus spécialisés dont un individu a besoin pour vivre et se reproduire. Au moment de son implantation dans l'utérus (au bout de 4 jours chez la souris et environ 1 semaine chez l'Homme), l'ADN de l'embryon se reméthyle. Ceci coïncide avec le passage de l'embryon d'un état de pluripotence « naïve » à « engagée », comme si la méthylation agissait comme un verrou de non-retour. Cette étape est ensuite suivie de la diversification des cellules de l'embryon vers différentes spécialisations (muscle, foie, neurone etc...). Certaines cellules se démarquent rapidement d'une fonction somatique (les tissus qui nous permettent de vivre) et s'engagent vers une voie dite germinale (les tissus qui nous permettent de nous reproduire). Ces cellules germinales, qui formeront à terme les spermatozoïdes ou ovules, subissent un nouvel effacement de leurs profils de méthylation. Elles ne regagneront de la méthylation de l'ADN que lors de la maturation finale en spermatozoïdes ou ovules, suivant le sexe de l'individu. Notre but est de comprendre le rôle de la méthylation de l'ADN dans ces prises d'identité cellulaire primordiales que subit l'embryon précoce.

En utilisant un modèle de culture de cellules embryonnaires souches (ES, qui dérivent de la culture d'un embryon en phase de pluripotence, c'est à dire apte à former tous les tissus, somatiques ou germinaux), nous avons montré que l'incapacité de méthyler le génome n'altère pas la transition d'un état de pluripotence naïve à engagée. Nous voulons maintenant prouver que la spécialisation en cellules somatiques est cependant impossible, et que ces cellules embryonnaires sans méthylation prennent par défaut une voie germinale. Pour cela, nous avons besoin d'une approche *in vivo*.

Notre projet a été élaboré en conformité avec le principe des 3R : Réduction, en pratiquant plusieurs analyses sur le même animal ; Remplacement, par l'utilisation de systèmes cellulaires ; et Raffinement, par une manipulation minimale des animaux vivants et l'application de procédures d'euthanasie en cas de signes de souffrance et de détresse de l'animal. 76 animaux seront utilisés pour ce projet:

16707 Le tube digestif est colonisé par un ensemble de microorganismes appelé microbiote intestinal. Ce microbiote colonise le tube digestif dès la naissance avec une succession bien précise de familles, genres et espèces bactériens dans les premières semaines de vie. L'étude d'animaux dépourvus de microbiote a permis de montrer que ce microbiote intestinal joue un grand rôle dans la maturation du tube digestif. Cependant, on connaît encore mal le rôle spécifique des différentes familles bactériennes et surtout des métabolites produits par ces bactéries dans cette maturation. L'objectif de ce projet est

d'étudier le rôle d'une famille particulièrement abondante dans les premiers jours de vie du porcelet, les Enterobactéries, et leurs métabolites sur le développement de l'intestin. Pour cela, un total de 36 porcelets sera utilisé. Dix-huit porcelets seront traités par voie orale de la naissance à 7 jours de vie par un antibiotique ciblant les Enterobactéries (colistine sulfate) afin de diminuer significativement la présence de cette famille bactérienne et de leurs métabolites dans le tube digestif. Un deuxième groupe de 18 porcelets recevra de l'eau et servira de groupe témoin. Après 7j, les porcelets seront sacrifiés pour permettre des prélèvements de tissus. Ce protocole respecte la règle des 3R. Remplacement: Les interactions entre microbiote intestinal et intestin sont complexes et encore impossibles à modéliser *in silico*. De la même façon, les connaissances sur le microbiote sont encore trop peu nombreuses pour reproduire la complexité du microbiote *in vitro*. Réduction: Le nombre d'animaux par groupe a été choisi afin de pouvoir appliquer des méthodes d'analyses biostatistiques qui devraient nous permettre d'identifier des métabolites bactériens fortement associés aux paramètres mesurés au niveau des cellules du tube digestif des porcelets. Raffinement: La procédure d'administration de la colistine ou de l'eau sera réalisée par des techniciens animaliers expérimentés et ne devrait pas engendrer de souffrance ou de douleur. Le suivi quotidien du poids corporel et de l'état de santé nous permettront d'évaluer les points limites.

16708 Le programme d'étude sur le cours d'eau en question a débuté en 1995 dans le cadre d'un suivi de la restauration des voies de migration de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*). L'objectif de ce programme était de rétablir les voies de migration de l'anguille sur l'ensemble du bassin versant, notamment sur deux barrages (équipement de passes et pièges de montée et de dévalaison) et d'estimer les effets du rétablissement de la migration sur la dynamique de la population d'anguilles.

Aujourd'hui, ce programme s'inscrit dans un cadre plus global de gestion de l'anguille à plusieurs échelles géographiques et sur l'ensemble du cycle biologique continental de l'espèce. Cette rivière est, en effet, Rivière Index du Plan de Gestion Anguille de la France. Il illustre bien les petits cours d'eau côtiers fragmentés par de nombreux ouvrages. Le suivi est donc mené tous les ans depuis 1995 en collaboration avec des organismes de recherches spécialisés, ce qui fait de ce bassin un véritable indicateur de l'état de la population d'anguilles avec une des chronologies de suivi les plus longues en France sur l'espèce. Les données récoltées dans le cadre de ce suivi concernent l'ensemble du cycle biologique : de la colonisation du bassin au départ vers la mer en passant par la phase de croissance dans le bassin et à la dévalaison des géniteurs vers l'océan. Les données permettent ainsi de mesurer les trois grands compartiments du cycle continental de l'anguille européenne que sont le recrutement fluvial, le stock et la dévalaison.

Afin d'enrichir les données sur la dynamique de la population et sur le déplacement des anguilles, une partie de la population est suivie par technique de télémétrie passive (protocole de Capture/Marquage/Recapture par PIT-Tag). Un maximum de 200 anguilles sont donc marquées annuellement sur le cours d'eau, soit 1 000 sur l'ensemble du projet. L'objectif est de pouvoir estimer les paramètres caractérisant la population d'anguille "sédentaire", marquer individuellement les anguilles capturées lors de l'estimation du stock, re-capturer les anguilles marquées par marquage individuel lors des campagnes précédentes, estimer les flux d'anguilles migrantes en montaison et en dévalaison ainsi que leurs caractéristiques.

Nous avons pris soin de veiller au respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), principe fondamentale en termes d'Expérimentation Animal, dans la mise en place de notre protocole :

- Le Remplacement de notre modèle biologique (Anguille européenne) s'avère impossible dans la mesure où l'objectif du projet est l'analyse d'une dynamique de population, impliquant des comportements de migration et de colonisation du milieu, des taux de croissances, variables en fonctions de nombreux critères abiotiques (température, débit de la rivière). De plus, le cycle biologique très particulier de l'anguille européenne (seul grand migrateur thalassotoque en France), rend impossible l'étude d'un autre modèle biologique de substitution sur le cours d'eau étudié.

- La Réduction du nombre d'animaux étudié a été optimisé grâce aux résultats des recaptures depuis 1989. En effet, entre 150 et 200 anguilles sont échantillonnées chaque année. Les années suivantes, entre 30 et 50 anguilles sont recapturées issues de cet échantillonnage annuel. Ce ratio de 30 à 50 anguilles est idéal afin d'effectuer des analyses statistiques annuelles robustes sur la dynamique de la

population (assez d'animaux pour rendre les résultats exploitables et pas d'excès pour analyser inutilement une proportion trop importante de la population). Un maximum d'animaux annuel marqué fixé à 200 anguilles semble donc adapté et raisonnable, soit 1 000 anguilles sur 5 ans.

- Le Raffinement de notre procédure est également un élément bien pris en compte afin de diminuer les contraintes et la douleur infligées aux anguilles. Dès la capture du poisson, celui-ci est placé en bain anesthésiant en milieu obscur, de manière à réduire son stress et accélérer l'anesthésie. Il est en effet reconnu qu'un bac de stabilisation de couleur foncé permet de réduire l'agitation des poissons lors de la stabulation. L'anesthésie s'effectue à l'aide d'une huile essentielle très bien connue et couramment utilisée, avec un dosage optimal, expérimenté et maîtrisé par notre structure depuis plus de 20 ans. Dès l'anesthésie du poisson, ce dernier est pris en charge par un personnel compétent, formé, qui applique strictement un protocole de marquage utilisé et amélioré par différentes structures de gestion et de recherche depuis les années 1990. L'anguille est ensuite placée en bac de réveil et relâchée dès la reprise complète de son activité de nage (réveil complet). La remise à l'eau du poisson s'effectue après contrôle du gradient de température entre le bac de réveil et le milieu récepteur, afin d'éviter tout choc thermique. Enfin, l'anguille est relâchée sur son lieu de capture, afin qu'elle puisse retrouver facilement sa zone d'habitat préférentielle.

16709 Les troubles du spectre autistique (TSA) résultent d'anomalies du neurodéveloppement qui apparaissent précocement au cours de la petite enfance et persistent à l'âge adulte. Ils se manifestent par des altérations dans la capacité à établir des interactions sociales et à communiquer, ainsi que par des anomalies comportementales, en particulier une réticence au changement et une tendance à la répétition de comportements ou de discours. Avec une prévalence alarmante, une naissance sur 100 en Europe, les TSA présentent un handicap lourd non seulement pour l'enfant qui en est atteint mais aussi pour son cercle familial. Alors que la composante génétique est impliquée dans 25% des cas, le rôle des facteurs environnementaux dont les polluants chimiques ainsi que leur interaction avec les facteurs génétiques restent peu étudiés. Plusieurs facteurs pré- et périnataux ont été incriminés tels que des infections virales comme celle de la rubéole ou certains médicaments (acide valproïque (VPA), thalidomide). Plus récemment, le rôle de certains polluants environnementaux en tant que facteurs aggravants dans l'émergence des TSA a été souligné. Des résultats récents obtenus chez l'Homme et chez l'animal suggèrent l'existence de modifications subtiles de différents registres comportementaux incluant les habiletés motrices, l'anxiété ainsi que l'attention chez des individus ayant été exposés précocement à des niveaux significatifs de retardateurs de flamme bromés dont l'HexaBromoCycloDoDecane (HBCDD), justifiant sa classification au niveau européen (système REACH) en tant que substance à très haut niveau de préoccupation et par la convention de Stockholm comme polluant organique persistant. L'homme est principalement exposé à l'HBCDD via l'alimentation et l'ingestion de poussières domestiques, l'exposition moyenne journalière en France étant estimée à 0,21ng/kg de poids corporel pour un adulte à plusieurs dizaines voire centaines de ng/kg chez le nouveau-né, le bébé et le jeune enfant. Alors que la neurotoxicité développementale de l'HBCDD a été récemment démontrée, ce projet se propose d'évaluer à présent les effets neurotoxiques d'une exposition périnatale à l'HBCDD et le rôle que cette exposition pourrait jouer en tant que facteur de susceptibilité dans un modèle expérimental de TSA induit par le VPA chez le rat. Le présent projet vise à développer et à caractériser un modèle de TSA chez le rat en s'appuyant sur le modèle reconnu du VPA pour l'autisme chez cette espèce animale, puis à évaluer les effets de l'exposition conjointe à l'HBCDD sur la pharmacocinétique du VPA et l'émergence des troubles neurocomportementaux de type TSA. Ce protocole expérimental objet de cette saisine vise ainsi (1) à évaluer chez le rat la pharmacocinétique du VPA à 3 niveaux de concentration, (2) à évaluer si une exposition répétée à l'HBCDD peut modifier la pharmacocinétique du VPA, et (3) à déterminer les modalités d'un modèle d'autisme induit par le VPA associé à une co-exposition à l'HBCDD. Ce projet d'une durée de 3 ans inclura un total de 80 rats femelles Wistar non gestantes, le but étant par la suite de transposer chez la femelle gestante le modèle de TSA ainsi défini. 72 animaux seront répartis en 6 groupes expérimentaux (n=12/groupe), 2 groupes recevant une dose unique de VPA (500 mg/kg) par voie i.p. après 12 jours d'exposition, les 4 autres étant administrés quotidiennement par voie orale (gavage) pendant 3 jours aux doses de 300 ou 500 mg/kg/jour. Dans ce cas, l'administration de VPA sera réalisée lors des 10e, 11e et 12e jour d'exposition à l'HBCDD. Que ce soit dans la condition VPA administré en i.p. ou par

gavage, 3 des 6 groupes seront administrés avec une solution huileuse d'HBCDD à la dose de 100 ng/kg/jour pendant 12 jours, les 3 autres groupes recevant au cours de la même période un volume équivalent de l'huile utilisée comme véhicule qui sera de l'huile d'avocat. Des prélèvements sanguins nous permettront de suivre la cinétique de l'HBCDD et du VPA sur 9 points sélectionnés durant les 18 heures qui suivent l'administration du VPA. Les animaux seront ensuite mis à mort selon les recommandations éthiques, à deux temps différents au cours de la cinétique (4h et 8h, 5 animaux à chaque temps) afin de prélever les organes d'intérêts en vue de réaliser des dosages de VPA dans ces tissus. Les 2 rats survivants seront utilisés pour réaliser les prélèvements à 18h avant d'être mis à mort et les organes prélevés en vue d'explorations ultérieures. L'ensemble des données sera intégré pour permettre la construction et la validation d'un modèle pharmacocinétique du VPA dans un contexte de co-exposition à l'HBCDD. Les données cinétiques qui seront alors produites par le modèle permettront alors de modéliser les interactions entre ces 2 composés dans la perspective de développer un modèle de TSA induit par le VPA et d'établir le caractère de susceptibilité pour le développement de ce trouble de l'exposition à l'HBCDD. Les rats femelles seront hébergés par 2 dans des cages ventilées de 900 cm² de surface, l'eau et la nourriture étant disponibles ad libitum. Les cages seront maintenues dans des conditions d'hébergement contrôlées (température 22+/-2°C, humidité 55+/-5%, cycle lumineux 12h/12h, lumière allumée à 8h). Le milieu sera enrichi avec des feuilles de papier absorbant de manière à éviter le grignotage des matières plastiques des objets habituellement utilisés qui contiennent des substances de toute sorte pouvant interférer avec l'HBCDD. Les animaux seront surveillés et les points limites suivants relevés (diminution de la consommation alimentaire et hydrique, baisse du poids corporel, modifications de l'apparence physique externe et du comportement de l'animal). Si l'un de ces points limites vient à apparaître, l'animal sera isolé et surveillé, voire mis à mort selon une méthode réglementaire (injection létale) en cas de persistance de l'état de mal-être de l'animal. Ce travail nécessite le recours à l'animal entier mimant la complexité de l'organisme pour pouvoir modéliser au plan cinétique le devenir de l'HBCDD et du VPA de manière à établir une possible interaction d'ordre pharmacocinétique entre les 2 composés (Remplacement). Le nombre d'animaux prévu pour cette étude est de 80. 72 rats seront utilisés pour l'expérience proprement dite, nombre estimé juste nécessaire et suffisant pour garantir la qualité des résultats tout en minimisant le nombre d'animaux qui sera utilisé pour l'expérience (Réduction et Raffinement). Huit rats supplémentaires seront réservés à la formation aux gestes techniques des personnels certifiés qui vont participer à l'expérience par des personnes formatrices en expérimentation animale ayant l'habilitation et la compétence pour ces gestes techniques (Raffinement), animaux qui seront maintenus en vie et pourront être réutilisés dans le cadre d'autres projets de formation (Raffinement).

16710 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire sévère qui touche le système nerveux central. Elle affecte plus de 100 000 personnes en France. La SEP est la première cause de handicap non traumatique chez les jeunes adultes. Cette maladie auto-immune résulte d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux constituants normaux de l'organisme. Elle entraîne une surmortalité et reste incurable de nos jours. Les travaux visant à mettre au point de nouveaux traitements cherchent à identifier des cibles potentielles, c'est à dire des molécules dont on pourrait modifier l'action, pour améliorer les symptômes de la maladie. Certains défauts de gènes comme l'IL-2 sont connus pour favoriser l'apparition de la maladie mais les mécanismes impliqués sont mal compris ce qui limite le développement de nouvelles thérapies ciblant cette molécule. L'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE) est un modèle de la SEP chez la souris utilisé pour étudier cette maladie et évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous proposons dans ce projet d'induire l'EAE dans notre modèle de souris modifiées pour un gène de la voie IL-2. Ce projet permettra une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de cette maladie et de manière plus générale, des maladies auto-immunes et ouvrira possiblement une nouvelle voie de thérapie ciblée. Les animaux sont produits dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et respecte la règle des 3R. Dans ce projet nous mettons en application la règle des 3R. Chaque fois que cela est possible le modèle animal sera remplacé par des études *in vitro*. Dans le cadre de ce projet l'utilisation de ce modèle animal reste inévitable puisqu'aucun autre modèle ne permet d'étudier la sclérose en plaque et le rôle du système immunitaire dans cette maladie. La compréhension de la maladie est essentielle pour développer de nouveaux traitements. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au strict minimum nécessaire à une

interprétation statistiquement significative des résultats. Les expérimentations sont mises en place de manière à extraire le plus d'informations possible sur le même animal, notamment en analysant plusieurs tissus. Au total 176 souris au maximum seront nécessaires à cette étude. Les protocoles utilisés dans ce projet sont bien définis dans la littérature. Cependant en fonction de nombreux paramètres tels que les conditions d'hébergement, le fond génétique des souris, le sexe des souris, le développement et la sévérité de la maladie peut varier. Un premier test d'induction de la maladie sera donc fait sur quatre animaux afin de valider et adapter si besoin le protocole expérimental. Au besoin et selon les résultats, un deuxième groupe de 4 souris est envisagé après modification du protocole afin de le valider. Les animaux seront surveillés et suivis quotidiennement. Une grille précise d'évaluation sera utilisée. Les souris seront élevées dans des conditions adaptées : locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture dans la cage pour favoriser l'hydratation et l'alimentation. Les animaux qui ont contracté l'EAE présenteront des déficits moteurs significatifs, les cages comporteront donc des refuges et des matériaux de nidification adéquats. L'inconfort provoqué par la maladie sera soulagé quand cela est possible (vidange de la vessie, hydratation par injection, séparation des souris pour éviter les traumatismes et assurer l'accès à la nourriture).

16711 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, multifactoriel 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.

16712 Le projet se place dans un contexte clinique de traitement de tumeurs cérébrales très agressives (glioblastomes) qui, selon leur localisation, peuvent ne pas être opérables. La radiothérapie conventionnelle est actuellement un traitement de référence dans de nombreux cancers. Dans le cas des glioblastomes, la combinaison de la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ne présente qu'une efficacité limitée du fait d'un taux de récurrences très élevé et le taux de survie très faible. Ce projet préliminaire exploratoire se place dans un contexte de développement de nano-objets qui peuvent réduire la toxicité de la radiothérapie et augmenter son efficacité en la combinant avec la thérapie photodynamique (PDT). La thérapie photodynamique est un traitement qui utilise des médicaments non toxiques à l'obscurité (appelés agents photosensibilisants ou photosensibilisateurs) en combinaison avec la lumière et l'oxygène pour tuer les cellules cancéreuses. La finalité de ce projet est de proposer une nouvelle modalité de traitement associant deux thérapies (thérapie bimodale) en couplant les rayons à haute énergie (rayons X utilisés dans le cas de la radiothérapie) à la PDT : la radio-PDT. Il s'agit d'une prise en charge nouvelle et non chirurgicale par rayonnement. Le concept général relève d'un nano-objet composé de deux principes actifs activables par transfert d'énergie : agent scintillateur aux propriétés radiosensibilisantes et/ou de contraste pour l'imagerie-agent photosensibilisant. Ce projet d'étude exploratoire *in vivo* (expériences réalisées sur les tumeurs implantées dans le cerveau des souris) vise à valider l'association des deux thérapies (transfert d'énergie). Ce projet fait suite à l'étude ayant montré l'efficacité *in vitro* sur une lignée cellulaire de glioblastome adulte. Le but de ce projet est de valider le concept de radio-PDT par mesures de bioluminescence des tumeurs traitées par radiothérapie seule ou par radio-PDT et analyse de survie des souris. Pour cela, trois procédures seront nécessaires. Les tumeurs seront implantées dans le cerveau des souris. Puis, les nanoparticules testées seront injectées quelques heures avant traitement de radiothérapie. Enfin, les souris seront imagées régulièrement tout au long de leur survie afin d'évaluer l'effet des traitements sur la croissance tumorale et la survie générale des animaux. Cette étude nécessitera 30 souris nude.

L'étude est réalisée dans le but de respecter la règle des trois R. Afin de contribuer au REMPLACEMENT nous essayons autant que possible de développer des méthodes alternatives par l'étude *in vitro*. Mais du fait de notre thème de recherche, la cancérologie, nous sommes contraints de développer des modèles animaux permettant de se mettre dans des conditions environnementales tumorales le plus proche possible de celles rencontrées chez l'être humain. Le suivi longitudinal par imagerie des animaux permet la REDUCTION du nombre d'animaux utilisés. Enfin, en conformité avec le RAFFINEMENT le bien-être des animaux sera évalué par un suivi quotidien (poids et comportement général des souris). Les souris seront anesthésiées pour toutes procédures stressantes et/ou douloureuses. La mise à mort sera effectuée dès lors que l'un des points limites sera atteint (perte de poids de plus de 20% par rapport au poids avant greffe s'étalant sur plus de trois jours ou état général et comportement affectés).

16713 La dermatite atopique est une maladie de la peau pouvant être associée à d'autres affections telles que l'asthme ou la rhinite allergique. La dermatite atopique, caractérisée par des démangeaisons et de l'eczéma, affecte 10% à 20% des enfants et 1% à 3% des adultes. Les patients présentent une inflammation de la peau et des niveaux d'immunoglobulines dans le sang anormal.

Notre laboratoire a mis au point un modèle murin de dermatite atopique, générée par l'application d'un analogue à la vitamine D sur la peau des souris. Grâce à ce modèle, nous avons identifié une cascade d'événements immunologiques qui aboutit à l'initiation de la réponse immunitaire dans les ganglions lymphatiques.

Dans ce projet, nous souhaitons poursuivre l'utilisation de ce modèle murin de dermatite atopique afin de déchiffrer le réseau immunitaire à l'oeuvre dans la réponse induite par l'application cutanée de cet analogue à la vitamine D. D'après nos travaux précédents, et en accord avec la littérature scientifique actuelle, une famille de cellules particulières, les cellules dendritiques, semble particulièrement impliquée dans l'initiation de la réponse immunitaire. Néanmoins, il y a plusieurs sous-types de cellules dans cette famille et le rôle de chacun de ces sous-types est encore mal défini. Nous disposons de lignées de souris génétiquement modifiées qui vont nous permettre d'éliminer spécifiquement certaines de ces cellules, afin de vérifier si l'induction de la maladie est abolie ou retardée chez ces animaux. De plus, de nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées arrivées au laboratoire vont permettre de caractériser la présence de récepteurs à la surface de ces cellules et de les inactiver. Ces récepteurs, ou les cellules qui les expriment, pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans cet objectif, l'analogue sera appliqué au niveau de l'oreille d'animaux génétiquement modifiés tous les deux jours, puis les échantillons seront collectés après 11 jours de traitement, et la réponse immunitaire sera caractérisée au niveau cellulaire et moléculaire. Nous analyserons l'expression des gènes et les compositions cellulaires au niveau de l'épiderme et du derme de l'oreille, ainsi qu'au niveau des ganglions drainants.

Remplacement: Les cibles (cellules et récepteurs) étudiées dans ce projet ont été identifiées grâce à des travaux menés *in vitro* et *in silico* par notre équipe ou par d'autres laboratoires. Les phénomènes à l'oeuvre dans ces réactions immunitaires mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour comprendre cette réponse inflammatoire et confirmer les résultats obtenus précédemment.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 10 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaire. Chaque lignée sera constituée de quatre groupes de 6 animaux, pour un total de 240 animaux au maximum. Deux groupes serviront à l'analyse de l'expression des gènes dans les ganglions lymphatiques et au niveau des oreilles des animaux. Ces animaux permettront également d'effectuer une analyse histologique de la peau. Les deux autres groupes seront utilisés pour caractériser les populations de cellules présentes dans ces organes. L'effectif de 24 animaux par lignée est l'effectif minimal qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés. De plus le traitement au niveau de l'oreille droite des souris nous permettra d'utiliser l'oreille gauche en tant que contrôle non traité.

Raffinement: l'administration de l'analogue à la vitamine D se fait par application cutanée, ce qui nécessite une anesthésie gazeuse légère. A partir du jour 9 jusqu'au jour 11 on observe un épaissement et une rougeur des oreilles. Cela peut être accompagné de légères démangeaisons, mais qui ne modifient pas le comportement des souris (toiletage, posture et activités normales). Néanmoins, si une souris présente un dos vouté, un pelage hérissé ou est inactive après stimulation, ou si des lésions au niveau des sites de traitement apparaissent, elle sera retirée de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Certaines lignées nécessiteront l'emploi d'injections intra-péritonéales. Les sites d'injections seront alternés et attentivement surveillés. En cas d'inflammation au niveau d'un site d'injection, l'animal sera retiré de l'étude et bénéficiera de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave, l'animal sera euthanasié immédiatement.

16714 L'insuffisance cardiaque (IC) est une maladie sévère touchant en Europe environ 6.5 millions de patients. Les traitements actuels de l'IC sont insuffisants, contribuant à placer l'IC comme première cause de mortalité parmi les maladies cardiovasculaires, avec en France 32 000 morts prématurées chaque année. Ces données représentent une forte incitation pour le développement des nouvelles approches thérapeutiques pour l'IC, notamment post-infarctus du myocarde (IDM) comme la première cause de l'IC. En parallèle du système vasculaire sanguin coronaire, le cœur est irrigué par un autre système vasculaire moins connu : les lymphatiques. Le dysfonctionnement du réseau lymphatique provoque l'œdème ainsi que l'inflammation. Nos travaux récents pointent vers un nouveau type de traitement de l'IC ciblant les lymphatiques, appelé la lymphangiogénèse thérapeutique, envisagé auparavant uniquement comme un recours potentiel chez des patients atteints d'œdème périphérique. Par contre, l'impact de la lymphangiogénèse sur l'œdème et l'inflammation au niveau cardiaque dans

différentes cardiomyopathies non-ischémiques qui également mènent au développement de l'IC, et ses conséquences sur la fonction cardiaque, n'ont très peu été abordés.

Dans ce projet, nous allons évaluer dans des modèles expérimentaux le rôle du drainage lymphatique au niveau du cœur chez la souris femelle dans deux modèles d'inflammation cardiaque : la myocardite (modèle EAM) et la sténose aortique induite par rétrécissement (constriction) aortique (modèle TAC). Le but ultime de cette recherche est d'aborder l'hypothèse selon laquelle les lymphatiques cardiaques pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires. Nous espérons que cette recherche permettra la mise en place d'une nouvelle classe de traitements permettant de limiter le développement de l'IC chez des patients. Cette recherche nécessite des expérimentations sur 258 souris.

Cependant pour respecter l'éthique de l'expérimentation animale, nous respecterons la règle des 3R (raffiner, réduire, remplacer), grâce aux stratégies suivantes :

- Pour raffiner ; les animaux sont hébergés aux normes requises et un enrichissement des cages est mis en place. Des points limites adaptés, une stratégie d'anesthésie et d'analgésie seront mise en place avec un suivi quotidien du bien-être animal. Nous allons dans ce projet utiliser que des souris femelles, ce qui diminuera les variations dans les réponses immunitaires, et permettra une meilleure comparaison entre nos modèles.

- Pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à cette étude nous réaliserons séquentiellement des mesures non-invasives de la fonction cardiaque (échographie, IRM) puis des mesures invasives (hémodynamique, lymphangiographie). Nous avons également mis en place une stratégie d'optimisation des prélèvements et des analyses *ex vivo* au moment de la mise à mort. De plus, nous avons réalisé des tests statistiques appropriés pour calculer le nombre de souris nécessaire afin de détecter une différence de 15% (ex : one way ANOVA et test de Tukey). Nos expériences dans le laboratoire ont démontré que des groupes de n=15 sont nécessaires pour des évaluations fonctionnelles tel que l'échocardiographie. Une meilleure survie post-opératoire permet de limiter le nombre d'animaux par groupe dans le modèle TAC.

- Dans l'objectif de remplacer l'expérimentation animale, nous mettrons en place certaines expériences par des études *in vitro* (prolifération de cellules, interactions cellules-cellules). Cependant l'utilisation des animaux est rendue nécessaire car il n'existe pas à ce jour de modèle de myocardite ou d'hypertrophie pathologique *in vitro*.

16715 La digestion et la régulation du métabolisme énergétique sont possibles notamment grâce aux cellules endocrines présentes dans l'intestin et le pancréas, qui produisent différentes hormones, comme l'insuline. 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 afin de comprendre comment ces cellules sont produites, en particulier dans l'intestin où elles constituent une population très diverse sécrétant une multitude d'hormones, et comment elles sont capables d'assurer leurs fonctions tout au long de la vie. Ces études devraient permettre à terme de mieux cerner les différentes pathologies et de proposer de nouvelles thérapies. Dans le but de mieux comprendre la physiopathologie des cellules endocrines intestinales, également appelées cellules entéroendocrines (EE), chez l'Homme, nous avons récemment mis au point la culture tridimensionnelle de mini-intestins humains *in vitro*, générés à partir de cellules souches pluripotentes induites, modifiées génétiquement ou non. Cependant, bien que ces mini-organes (ou organoïdes ou HIOs pour Human Intestinal Organoids) aient déjà permis de répondre à un certain nombre de questions, leur maturation *in vitro* reste limitée à celle d'intestins embryonnaires qui ne sont pas pleinement fonctionnels, en particulier regardant le développement des cellules EE et la production d'hormones. Une technique de choix pour obtenir la croissance et la maturation des HIOs consiste à les transplanter sous la capsule rénale de souris NSG (lignée immunodéprimée qui tolère des greffes) où leur développement est facilité grâce à l'apport sanguin fourni par la vascularisation de l'hôte. Les transplants présentent alors des fonctions de digestion et d'absorption ainsi que des réponses physiologiques très proches de celles observées dans l'intestin humain adulte. Nous souhaitons donc réaliser ce type de transplantation en mettant en œuvre des protocoles bien établis, utilisés couramment par un de nos collaborateurs et pour lesquels nous pourrions bénéficier d'une

formation. Cette formation pourra être réalisée sur des souris de réforme de la zone SPF (8-10 souris soit 2 par expérimentateur) qui seront sacrifiées au bout de la procédure. Nous veillerons à utiliser toutes les procédures pré- et post-opératoires nécessaires au bien-être animal : asepsie, anesthésie, traitement antibiotique afin d'éviter les infections microbiologiques, et analgésique pour éviter la douleur, suivi quotidien. Avant le terme de l'expérience, nous envisageons de vérifier la prise et la croissance des transplants en réalisant une échographie du rein, procédure indolore et de courte durée, nécessitant une brève anesthésie gazeuse, qui ne devrait pas affecter le bien-être des animaux. Les souris NSG transplantées seront sacrifiées au bout de 8 à 16 semaines, temps nécessaire au bon développement des greffons, qui seront alors prélevés pour réaliser des analyses histologiques, biochimiques et de biologie moléculaire. Le nombre estimé de souris NSG qui seront transplantées (110 sur une période de 5 ans) prend en compte les différents types d'organoïdes greffés (mini-intestins ayant différentes modifications génétiques dans les gènes responsables de la destinée ou de la fonction des cellules endocrines), les pertes éventuelles suite aux procédures chirurgicales, ainsi que les analyses statistiques qui seront effectuées. En effet, par gène étudié, un test statistique approprié tel que le test non paramétrique de Mann-Whitney, applicable dans ce type d'étude, nécessite un minimum de 4 à 5 échantillons par génotype (comparaison de 4-5 transplants modifiés génétiquement à 4-5 transplants témoins non modifiés). La transplantation des HIOs représente un atout considérable pour étudier et comprendre la physiopathologie des cellules entéroendocrines humaines, qui à ce jour, ne peut être remplacée par un système *in vitro*.

16716 Le rôle des médiateurs de l'inflammation et notamment celui des cytokines au cours des pathologies inflammatoires chroniques de la peau, telles que le psoriasis, est un enjeu majeur tant en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée (développement de biothérapies ciblant les cytokines). La description de l'activité des cytokines proinflammatoires, qui agissent la plupart du temps en réseau et de manière synergique dans l'organisme, permet d'identifier celles qui jouent un rôle primordial dans la physiopathologie de la maladie et d'en faire de potentielles cibles thérapeutiques. Parmi ces cytokines, les interleukines 1, 17 et 22 (IL-1, IL-17 et IL-22) ainsi que l'oncostatine M (OSM) ont fait l'objet de nombreuses études, leurs expressions et leurs rôles ayant été décrits *in vitro* chez l'homme et *in vivo* chez la souris, grâce au modèle de dermatite psoriasiforme induite par application topique d'imiquimod (Aldara 5%). Ce modèle murin de psoriasis décrit il y a plus de 10 ans fait référence dans le domaine de l'immuno-dermatologie et a été cité dans plusieurs centaines de publications à ce jour. Bien que reproduisant de nombreuses caractéristiques physiopathologiques et histologiques de la maladie humaine, ce modèle fait l'objet d'une critique majeure liée à son caractère inflammatoire aigu. En effet, une inflammation cutanée forte est obtenue au bout de 5 à 6 jours seulement d'application quotidienne d'imiquimod, alors que le psoriasis est considéré comme une maladie chronique. De plus, certaines cytokines comme l'oncostatine M sont décrites dans d'autres modèles murins d'inflammation pour jouer un rôle dans la phase chronique/tardive de la maladie et ne peuvent donc être correctement étudiées dans ce modèle d'inflammation cutanée à court terme. Pour pallier ce défaut, un modèle de psoriasis chronique a été décrit chez la souris consistant à appliquer l'imiquimod sur l'oreille et la peau du dos de l'animal de manière séquentielle pendant 9 semaines. Outre le rôle des cytokines, celui du récepteur TRPV1 (transient receptor potential vanilloïde 1) a été également décrit pour jouer un rôle dans la maladie. Ce récepteur exprimé au niveau de la peau est connu pour sa contribution à l'inflammation neurogène, mais son rôle dans le dialogue entre les différentes cellules résidentes de la peau (kératinocytes, cellules nerveuses et endothéliales) est peu connu à ce jour.

Grâce à ce nouveau modèle chronique de psoriasis, nous souhaitons étudier *in vivo* chez la souris le rôle des cytokines et de TRPV1 dans la phase chronique de la maladie. Pour mener à bien ces travaux, nous disposons de plusieurs lignées de souris transgéniques, génétiquement invalidées pour les gènes codant les cytokines OSM, IL-22 et le récepteur de l'OSM, mais aussi différentes lignées de souris, dont l'expression du récepteur TRPV1 est constitutivement invalidée ou de manière spécifique dans l'épiderme, l'endothélium ou par les cellules nerveuses. L'absence d'expression de ces cytokines ou des récepteurs chez ces souris permettra d'étudier leur rôle précis et leur importance dans la physiopathologie du psoriasis.

Un total de 336 souris sera nécessaire pour mener à bien l'ensemble du projet. La règle des 3R, établie par Russel et Burch, a été prise en compte de la manière suivante :

-Remplacer : cette étude *in vivo* fait suite à des expériences menées *in vitro* et nécessite des expérimentations chez l'animal permettant d'étudier dans un système intégré le dialogue entre les différentes populations cellulaires qui composent la peau. Elle utilise la souris, une espèce couramment utilisée en immuno-dermatologie. Son système immunitaire et ses réponses humorales et cellulaires ont été largement décrits depuis de nombreuses années, font référence dans le domaine et évitent d'avoir recours à des espèces mammifères plus proches de l'homme.

-Réduire : Le nombre maximal d'animaux inclus dans l'étude a été déterminé de manière à pouvoir tester toutes les lignées d'animaux, mais défini au plus juste pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

-Raffiner : la notion de raffinement a été appréhendée au travers des conditions d'expérimentation et d'élevage qui sont optimisées (hébergement en groupe, nid, enrichissement, sédation et/ou analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante ...) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

16717 Les maladies atopiques, incluant la dermatite atopique (également appelée eczéma), l'asthme, la rhinite allergique et les allergies alimentaires, sont des maladies inflammatoires complexes, impliquant différents sites du corps, avec des caractéristiques communes. Le terme "marche atopique" fait référence à la séquence naturelle des manifestations atopiques, qui montre que la dermatite atopique précède le développement des autres maladies atopiques, et que la sévérité de la dermatite atopique influence le cours de l'allergie respiratoire. Une meilleure compréhension des mécanismes de la marche atopique est cruciale afin de développer des stratégies de préventions et de nouveaux traitements des maladies atopiques.

Nous avons mis au point dans notre laboratoire un modèle mimant les caractéristiques de la marche atopique chez la souris. Dans ce modèle, nous utilisons une technologie permettant de générer des micropores dans la peau (technique également utilisée chez l'Homme dans la sphère médicale) puis nous appliquons un allergène (l'ovalbumine) sur la peau de souris. Cette étape engendre une dermatite atopique liée à une réponse immunitaire caractéristique des allergies, et provoque une sensibilisation de la souris à l'ovalbumine. Nous avons la possibilité de modifier la profondeur des micropores, ce qui nous permettra de mimer différentes sévérités de dermatite atopique. Pour cette étude, nous étudierons 4 niveaux de sévérité qui génèrent des réponses immunitaires et inflammatoires différentes. Deux semaines après le début de la sensibilisation, nous allons réexposer les souris à l'ovalbumine au niveau des poumons, ce qui va entraîner une réponse allergique similaire à un phénomène asthmatique. Ce protocole sera appliqué à 11 lignées de souris génétiquement modifiées permettant de caractériser le rôle de différentes cellules et de différents gènes. Une analyse des paramètres de la réaction immunitaire au niveau de la peau et au niveau des poumons sera effectuée à la fin du protocole, afin de mieux comprendre les mécanismes de la marche atopique.

Remplacement: Les lignées de souris génétiquement modifiées utilisées dans ce projet vont nous permettre d'inactiver certaines cellules ou certains gènes, dont l'implication dans la réponse immunitaire allergique a été suggérée *in vitro* par d'autres équipes de recherche. De plus, les expériences menées précédemment dans notre laboratoire ont permis d'élaborer un modèle *in silico* prédisant un rôle de ces cellules et gènes dans la sensibilisation aux allergènes. Néanmoins, les phénomènes à l'oeuvre dans la marche atopique mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour confirmer ces résultats, pour comprendre les processus responsables de la marche atopique et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 11 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaire. Afin de diminuer la variabilité des résultats, des souris de fonds génétiques purs seront utilisées. Pour chaque lignée, 10 animaux modifiés seront comparés à 10 animaux contrôles pour les 4 niveaux de sévérité de dermatite atopique. Pour cette étude, un nombre maximal de 800 souris sera utilisé. Cet effectif nous permettra

d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés, et de conclure quant au rôle des cellules et des signaux cellulaires étudiés dans la marche atopique. Des stratégies expérimentales seront mises en place dans le but de diminuer le nombre d'animaux. Par exemple, les lignées chez lesquelles des gènes d'intérêts sont inactivés dans tout l'organisme seront étudiées en premier. Uniquement dans le cas où un rôle de ces gènes dans la marche atopique est mis en évidence, des lignées chez lesquelles ces gènes sont inactivés dans des cellules spécifiques seront étudiées, afin d'identifier les cellules du système immunitaire impliquées dans ce phénomène.

Raffinement: La rupture de la barrière épidermique par génération de micropores est peu douloureuse, notamment comparée à la méthode classique utilisée précédemment au laboratoire. L'application topique de l'ovalbumine et l'instillation intra-nasale de l'ovalbumine nécessitent une anesthésie gazeuse légère et une anesthésie générale légère respectivement. Après ces manipulations, les animaux seront placés sur une plaque chauffante et seront surveillés jusqu'au réveil. Tout au long du protocole, la surveillance des animaux aura lieu deux fois par semaine durant la phase de sensibilisation, et tous les jours durant la phase de réexposition à l'ovalbumine au niveau des poumons par instillations intra-nasales. La surveillance sera visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, de sa posture et de son comportement. Si l'animal présente un dos vouté, un pelage hérissé, est inactif après stimulation, ou si les points d'injections présentent des signes d'infection ou d'inflammation, il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement.

16718 Contexte scientifique, médical et social

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont un enjeu majeur de santé publique. Ils sont responsables de la troisième cause de mortalité et de la première cause de handicap acquis dans les pays occidentaux. La majorité des AVC est causée par la présence d'un caillot dans une artère du cerveau, on parle alors d'infarctus cérébral ischémique (ou AVC ischémique). Le seul traitement possible est de déboucher l'artère occluse : c'est la reperfusion. Bien que bénéfique, la reperfusion provoque également des lésions supplémentaires incluant la mort des cellules du cerveau. Cette mort cellulaire est due en partie à l'ouverture d'un pore au niveau de la mitochondrie, cœur énergétique de la cellule, appelé "pore de transition de perméabilité mitochondrial" (mPTP). Il est connu en cardiologie depuis une trentaine d'année qu'une succession de cycles d'occlusion et de reperfusion précédant directement l'épisode ischémique permet de réduire la taille de l'infarctus, notamment en empêchant l'ouverture de ce pore. La ciclosporine A (CsA), possède cette même capacité d'inhiber l'ouverture de ce pore. Cependant dans le cerveau, la barrière hémato encéphalique (BHE) protège le cerveau des substances toxiques. Plus de 98% des petites molécules testées en neuroprotection ne peuvent pas franchir la BHE. Cette barrière s'ouvre spontanément 24 heures après réalisation d'une ischémie cérébrale permanente. L'utilisation d'ultrasons (US) couplée à des injections intraveineuses de microbulles permet d'ouvrir la BHE de manière mécanique, ciblée, et ce transitoirement pendant plusieurs heures. Nous faisons l'hypothèse que la CsA pourrait avoir une action de neuroprotection au niveau des cellules du cerveau après ouverture de la BHE.

Objectifs du projet – procédures – effets néfastes

L'utilisation d'ultrasons est une technique d'imagerie non invasive et l'injection de microbulles est également utilisée en routine clinique en cardiologie. Ce projet de recherche fondamentale de 3 ans a pour objectif d'étudier le passage de la CsA dans le cerveau après ouverture de BHE mécaniquement chez la souris et de déterminer si elle a une action sur le mPTP des mitochondries neuronales. Le modèle murin d'ischémie cérébrale permanente ou transitoire est largement utilisé en recherche préclinique afin de tester des traitements. 80 souris au maximum seront nécessaires, anesthésiées et opérées par des personnes compétentes et qualifiées pour occlure de manière permanente une artère irriguant le cerveau. La procédure 1) de mise au point de la technique d'ouverture de la BHE est classée légère et n'engendra pas d'effets néfastes. Les procédures 2) et 3) seront sans réveil. Enfin, la procédure 4) où l'infarctus cérébral pourra entraîner des déficits moteurs chez les animaux est classée en risque modéré.

Conformité à la règle des 3R

Remplacement: Notre étude ayant pour but d'évaluer l'effet neuroprotecteur de la CsA, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. De plus, celle-ci s'appuie sur des résultats préliminaires obtenus *in vitro* sur cellules neuronales.

Réduction: Le nombre minimal et suffisant d'animaux a été estimé en tenant en compte la mortalité liée à l'intervention chirurgicale.

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. Des procédures avec imagerie cérébrale seront réalisées. Afin de supprimer la souffrance et la douleur, la chirurgie est entièrement réalisée sous anesthésie générale avec prémédication analgésique et anesthésique locale adaptée. En soins post-opératoires, nourriture et boisson sous forme gélifiée seront mises à disposition de l'animal en plus de la nourriture et boisson habituelles, les groupes sociaux seront conservés et un protocole analgésique continu sera mis en place. De plus l'ischémie cérébrale pouvant entraîner des déficits neurologiques avec une diminution des capacités locomotrices de l'animal, 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. Enfin, 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.

16719 Il est connu depuis plusieurs décennies que les carences en vitamines B9 (folates) et B12 pendant la grossesse peuvent être à l'origine de malformations chez le nouveau-né, notamment le défaut de fermeture du tube neural. Depuis les années 1990, l'Organisation Mondiale de la Santé préconise une supplémentation en folates chez les femmes en période péri-conceptionnelle et durant le premier trimestre de la grossesse, ce qui a permis une réduction de ce type d'anomalie de l'ordre d'environ 30%.

Des modèles animaux ont permis de mettre en évidence que l'exposition précoce à une telle carence en vitamines B9 et B12 peut entraîner une altération du développement du cerveau ainsi qu'une susceptibilité plus grande à des désordres psychiatriques, tels que l'anxiété, la dépression, mais aussi l'autisme ou la schizophrénie. Nos travaux antérieurs ont permis de montrer qu'une carence précoce en donneurs de méthyles (vitamines B9 et B12) entraînait des désordres métaboliques et épigénétiques altérant le développement cérébral en période post-natale.

Au cours de ces dernières années, il est apparu que le comportement alimentaire du père avait une grande importance sur le développement du fœtus et la santé de l'enfant à naître. D'une manière générale, les hommes sont plus exposés que les femmes aux facteurs environnementaux, ce qui pourrait entraîner un risque de déficience en folates. Ces facteurs concernent le tabagisme, la consommation d'alcool mais aussi une alimentation plus pauvre en fruits et légumes qui constituent le principal apport en folates. Les données épidémiologiques suggèrent des modifications phénotypiques de nature transgénérationnelle reliées à des altérations épigénétiques dans le sperme des pères carencés. Des études menées sur des souris mâles ont montré qu'une déficience en folates d'origine paternelle entraîne une altération des processus de régulation du génome dans le sperme, associée à un risque de mort prématurée et des malformations crânio-faciales et musculosquelettiques chez la descendance. En dehors des données sur les processus de régulation du génome du sperme, les effets potentiels de la carence d'origine paternelle restent très peu documentés, notamment au niveau du cerveau.

Notre projet consiste en la mise en place d'un modèle animal de carence paternelle en folates afin d'étudier les conséquences sur le développement cérébral chez la descendance et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à rétablir l'homéostasie en folate dans le cerveau.

1. Remplacement : Il n'existe aucune alternative d'approche *in vitro* car notre étude porte sur les effets transgénérationnels d'une carence nutritionnelle paternelle sur le développement et le vieillissement des individus.

2. Réduction : Notre étude portera sur 100 rats de laboratoire (10 mâles reproducteurs et 10 femelles reproductrices), pour une progéniture estimée à 80 ratons répartis en 2 groupes d'études. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, à savoir 10 animaux par groupe, permettant ainsi l'interprétation scientifique des résultats par des tests statistiques appropriés. Les animaux maintenus en vie à l'issue du projet serviront à compléter des effectifs pour d'autres protocoles à venir, ou mis à disposition d'autres animaleries en cas de besoin (notamment pour les enseignements), ou encore mis à mort si aucune option n'était retenue.

3. Raffinement : Nous commençons chaque protocole expérimental par une période d'acclimatation de 2 semaines à ce nouvel environnement. Les animaux sont hébergés à 2 par cage pour empêcher l'isolement social et sont surveillés quotidiennement. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé à 20% de perte du poids corporel avec un repérage des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, déshydratation, yeux et abdomen creux). Selon notre expérience, aucune souffrance ne devrait être induite chez les animaux car les procédures sont basées sur des modifications alimentaires de quelques semaines (carence vitaminique chez 5 mâles durant 4 semaines). En fin de protocole les animaux (mâles reproducteurs et portées) seront anesthésiés et mis à mort selon la directive 2010-63-UE et des prélèvements seront effectués (sang, cerveau, organes génitaux) pour permettre de faire des analyses biochimiques et d'observer les changements métaboliques dans chaque organe.

16720 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont caractérisées par des poussées inflammatoires de durée variable et impactant très lourdement la qualité de vie des patients. Des études prédisent une prévalence des MICI entre 0.5% à 1% à partir de 2030 et l'incidence grandissante gagne peu à peu les pays en cours d'industrialisation. L'étiologie de ces pathologies reste encore très mal connue et les facteurs de risque environnementaux identifiés jusqu'alors ne peuvent expliquer toute la pathogenèse des MICI et l'explosion de leur incidence. Un cluster de sur-prévalence de la maladie de Crohn (MC) est notamment situé dans le nord de la France, région très sujette aux épandages massifs de produits phytopharmaceutiques (PP). Tout individu est exposé au cours de sa vie à un nombre important de PP en particulier par l'alimentation avec des effets cumulatifs inconnus. Nous émettons l'hypothèse que l'exposition aux pesticides pendant des phases critiques du développement (grossesse, allaitement et l'enfance) pourrait favoriser la survenue des MICI. L'objectif de cette étude est donc d'étudier l'impact de l'exposition chronique à un mélange de 3 PP couramment utilisés, que sont le prosulfocarbe (herbicide), le mancozebe (fongicide) et le glyphosate (herbicide) sur l'homéostasie intestinale et la susceptibilité aux MICI dans un modèle de colite expérimentale chez le rat. Le caractère novateur de ce projet réside dans l'étude d'effets cumulatifs non intentionnels d'un cocktail de 3 pesticides à faible dose reçus de façon chronique au cours de 3 périodes critiques de la vie (gestation, lactation et enfance), sur le risque de déclencher des mécanismes pathogéniques impliqués dans les MICI, et sur la réponse à une inflammation du colon (colite) expérimentale dans le cadre d'un modèle animal de MICI (colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS)). Des rates Wistar seront exposées au cocktail de pesticides (8 rates) ou non (témoins, 8 rates) pendant toute la gestation et la lactation, ainsi que leur descendance respective. Un enrichissement (chips et rouleaux en carton) sera mis à disposition des animaux. 8 groupes d'animaux seront créés avec 12 mâles et 12 femelles/condition: non soumis au cocktail de pesticides et non soumis à la colite expérimentale ; non soumis au cocktail de pesticides et soumis à la colite expérimentale ; soumis au cocktail de pesticides et non soumis à la colite ; soumis au cocktail de pesticides et soumis à la colite expérimentale. Les 12 animaux/groupe expérimental seront nécessaires pour l'obtention d'une bonne représentativité statistique. Le nombre total d'animaux est de 118. La colite expérimentale sera induite par instillation intrarectale de TNBS à J53 chez l'animal anesthésié à l'isoflurane (Isovet 5% et 2L/mn pour chargement de la boîte puis passage au masque: 1 à 2% et 1L/mn), avant mise à mort des animaux à J60 par injection létale d'Exagon. Tous les paramètres d'intérêt caractérisant le développement et l'intensité de la colite seront étudiés chez la descendance mâle et femelle (suivi de poids et de prise alimentaire, marqueurs inflammatoires systémiques et coliques, histologie). La découverte de ces facteurs permettra de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et d'adapter à terme des stratégies de prévention avant et après le déclenchement de processus pathologique. Nos données pourront aussi contribuer à la définition de toxicité dans la population et être intégrées aux dispositifs de

surveillance de type phytopharmacovigilance et biosurveillance. Notre projet respecte la règle des 3R. Le recours au modèle animal rat est justifié par l'absence de méthodes alternatives pour les études physiologiques et comportementales telle que des modèles *in vitro*. De plus, nous étudions des paramètres liés à la survenue de l'inflammation intestinale ainsi que son intensité et de troubles métaboliques potentiellement associés chez la descendance de rates gestantes soumises à un cocktail de pesticides, impossible à modéliser autrement que par une étude chez l'animal de laboratoire. De plus, les interactions entre différentes fonctions physiologiques et organes (système digestif, microbiote, foie, tissu adipeux et cerveau) est impossible à reproduire par un modèle *in vitro*. Nous savons également que l'inflammation colique peut produire une élévation de la température corporelle qu'un organisme vivant peut compenser par la mise en place de mécanismes d'adaptation par le biais de certaines fonctions telle que le sommeil ou la prise alimentaire, contrairement à des cellules en culture. De plus le modèle d'induction de la colite expérimentale chez le rat est bien décrit dans la littérature et maîtrisé par l'expérimentateur du projet. Les points limites seront basés sur une observation quotidienne des rats pour attribuer une note à partir d'une grille d'évaluation du score. Les paramètres à observer sont l'apparence, la prise alimentaire et hydrique ainsi que le poids de l'animal, le comportement naturel et le comportement provoqué par un stimulus externe. Si un de ces paramètres est modifié, un examen clinique sera réalisé avec prise de la température corporelle, toucher abdominal, examen de la peau et des fréquences cardiaques et respiratoires. L'inflammation digestive peut induire une asthénie générale, une perte de poids et d'appétit. Tout au long du protocole et après induction de la colite, l'examen et le suivi des animaux sera pratiqué tous les jours, le matin et en fin d'après-midi et ce pendant 7 jours par l'expérimentateur du projet ou une personne du laboratoire habilitée, et le cahier de suivi de bien-être animal sera rempli et complété en conséquence. Dans la mesure où le modèle est un modèle inflammatoire, aucun traitement anti-inflammatoire ne pourra être pratiqué. Si toutefois l'animal présente une apathie trop sévère accompagnée d'une perte de poids trop importante, une hémorragie, une paralysie partielle ou totale, des convulsions et/ou tremblements sévères, une distension de l'abdomen (généralement accompagnée de diarrhée ou constipation), il sera euthanasié car la prise d'antibiotiques et/ou d'anti-inflammatoires rendront inexploitable les résultats de l'étude.

16721 L'émergence d'un nouveau domaine de l'oncologie s'intéressant aux déficits cognitifs chez les patients atteints de cancer, s'explique par l'existence de déficits de la mémoire, de la concentration et de l'attention ainsi que des fonctions exécutives liés aux traitements ou au cancer. En parallèle aux essais cliniques, il existe un programme de recherche translationnelle réalisée chez les rongeurs impliquant des études comportementales afin d'évaluer le rôle direct du cancer ou de ses traitements sur les émotions et les fonctions cognitives, associées à l'étude des mécanismes neurobiologiques impliqués. Son objectif a pour but la prévention future des conséquences à long-terme sur la survie, la qualité de vie, le retour au travail et/ou l'autonomie des patients par une prise en charge spécifique.

Le but du projet est de caractériser chez la souris l'impact de 3 types de mélanomes et/ou de leurs traitements par immunothérapies (3 traitements et/ou leur combinaison) et/ou chimiothérapie sur les fonctions cérébrales et d'identifier de potentiels impacts cognitifs et neurobiologiques, potentiellement non détectés chez les patients car non évalués. Afin de vérifier les liens entre inflammation systémique et impacts cognitifs des immunothérapies, les immunothérapies seront également évaluées en l'absence et en présence d'injections systémiques de cytokines pro-inflammatoires ou de leur combinaison. Un total de 86 groupes de souris seront utilisés au cours de chacune des 3 procédures comportementales pour évaluer l'anxiété, la dépression, l'activité exploratoire, mais également l'apprentissage spatial, la flexibilité comportementale, ainsi que les mémoires spatiale et non spatiale. Le nombre d'animaux par groupe est fixé à 15 afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques pertinentes, tout en tenant compte de décès éventuels ou de mise à mort anticipée. Un total de 3786 animaux sera nécessaire pour la mise en place et la réalisation de ce projet qui durera 5 ans. Durant les 5 ans du projet, sur la totalité des souris nécessaires, 3204 animaux (lignées tumorales 1 et 2) recevront des traitements anticancéreux (immunothérapies ou chimiothérapies ou combinaisons), en l'absence ou en présence de cytokines, pendant une période de 5 à 6 semaines maximum aux cours desquelles des tests comportementaux seront réalisés pendant 1 à 2 semaines avec un test par jour. Au cours de la 6ème ou 7ème semaine les cerveaux des animaux seront prélevés pour effectuer des

études neurobiologiques. Dans le cas de la 3^{ème} lignée tumorale, les 582 souris porteuses de tumeurs ou leurs contrôles recevront ces traitements anti-tumoraux pendant 16 semaines et des tests comportementaux quotidiens seront réalisés quotidiennement pendant un maximum de 2 semaines avant les prélèvements de cerveaux.

L'ensemble du projet respecte la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). L'utilisation de l'animal est indispensable afin de déterminer le rôle direct et/ou en combinaison avec des cytokines circulantes et/ou un cancer de traitements du cancer, tels que des immunothérapies qui impliquent le système immunitaire adaptatif intégré, dans l'apparition de troubles comportementaux éventuels. De plus, l'animal est indispensable pour pouvoir évaluer les effets du cancer et de ses traitements sur les fonctions cognitives et pour comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans l'apparition éventuelle de troubles. Afin de réduire le nombre total d'animaux, plusieurs procédures comportementales seront réalisées sur les mêmes animaux. De plus, les animaux nécessaires aux prélèvements d'échantillons qui serviront aux études biologiques sur les cerveaux et les dosages plasmatiques, seront les animaux qui auront été utilisés lors des analyses comportementales. Le travail effectué sur ces prélèvements biologiques chez les mêmes animaux permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les modifications comportementales. Les conditions d'hébergement seront conformes aux normes réglementaires européennes. Les expériences débuteront après une acclimatation des animaux aux conditions d'hébergement et à la manipulation par l'expérimentateur. Avant chaque test comportemental les souris seront familiarisées à la pièce d'expérimentation pendant 30 min. Durant toute la durée de l'expérimentation, un suivi quotidien des animaux sera réalisé par un personnel expérimenté notamment au moment de la pesée/administration des traitements et permettra de déceler un éventuel signe de souffrance. Dans ce cas, une prise en charge de la douleur sera faite et le suivi des animaux sera renforcé.

16722 Le mélanome est un cancer de la peau qui se développe à partir des mélanocytes, les cellules responsables de la pigmentation cutanée. Il s'agit de l'un des cancers les plus agressif en raison de sa capacité à former des métastases et donc de se répandre dans notre organisme et de part sa grande résistance à la plupart des traitements actuels (chimio- et radiothérapie).

Le système immunitaire a pour rôle de maintenir l'homéostasie et de détruire les éléments étrangers à notre corps, en particulier les cellules cancéreuses. Cependant, pour se développer et proliférer, les cellules cancéreuses sont capables d'altérer le fonctionnement normal des cellules immunitaires. Ainsi, il est reconnu que les cellules immunitaires localisées à proximité des tumeurs, donc dans leur environnement, échouent non seulement à générer une réponse anti-tumorale efficace, mais interagissent également avec les cellules malades pour favoriser l'expansion et l'invasion des tumeurs. Ces dernières années, la prise en charge du mélanome a largement bénéficié du développement d'une nouvelle classe de traitement, l'immunothérapie, dont l'objectif est de pousser les cellules immunitaires à s'attaquer aux cellules cancéreuses. Néanmoins, tous les patients ne répondent pas de manière équivalente à ces traitements et des recherches sont nécessaires pour pouvoir mieux prédire la réponse au traitement ou pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

La lymphopoiétine stromale thymique (TSLP) est une molécule produite par différentes cellules, dont celles qui composent la peau appelées kératinocytes. De récentes études suggèrent que TSLP a un rôle dans le développement et la croissance de certains cancers en modifiant le fonctionnement normal du système immunitaire. Des recherches préliminaires réalisées par notre laboratoire ont montré que les kératinocytes produisaient plus de TSLP dans le mélanome. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la production de TSLP par les kératinocytes pourrait jouer un rôle important dans la progression et la métastase de la tumeur en perturbant la réponse immunitaire.

L'objectif de ce projet est d'approfondir les connaissances des modalités d'interaction entre les cellules cancéreuses, les kératinocytes et les cellules immunitaires. Nous chercherons notamment à comprendre de quelle manière les kératinocytes, via TSLP, permettent au mélanome d'échapper au système immunitaire et quelles sont les cellules immunitaires et molécules impliquées dans ces interactions. En effet, une meilleure compréhension de ces mécanismes nous permettra de trouver de

nouvelles stratégies pour reprogrammer l'immunité et trouver de nouveaux marqueurs qui caractérisent le mélanome.

Pour répondre à nos questions, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées : des souris ayant les mêmes mutations que celles trouvées chez l'Homme et/ou qui n'ont pas la molécule d'intérêt pour pouvoir en étudier son rôle sur la croissance des tumeurs et métastases. Nous utiliserons également des souris qui présentent des absences de certaines cellules immunitaires pour déterminer leur rôle.

Remplacement : Les lignées de souris génétiquement modifiées utilisées dans ce projet vont nous permettre d'étudier des gènes ou cellules dont l'implication dans le mélanome a été suggéré *in vitro* par notre laboratoire ainsi que d'autres. Les phénomènes à l'œuvre dans le mélanome cutané mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires qui composent l'ensemble du microenvironnement tumoral. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour comprendre ce phénomène et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction : Afin de différencier les rôles de différentes molécules pouvant être impliquées dans le développement du mélanome, l'ensemble du projet va nécessiter l'utilisation de 13 lignées de souris différentes et d'un maximum de 709 animaux (minimum de 451 animaux, en fonction des résultats). Ce nombre d'animaux nous permettra d'obtenir des conclusions statistiquement significatives. Par ailleurs, des études préliminaires *in vitro* ont été réalisées afin d'éliminer certaines hypothèses et de mieux définir les expériences à effectuer sur les modèles *in vivo*.

Raffinement : Pour l'ensemble des animaux, la surveillance sera visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, sa posture et son comportement. Si l'animal présente un dos voûté, un pelage hérissé, est inactif après stimulation, ou si les points d'injections présentent des signes d'infection ou d'inflammation il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement. Pour les souris développant des tumeurs cutanées, un suivi particulièrement attentif des animaux sera effectué chaque jour. Le diamètre des tumeurs sera mesuré avec un pied à coulisse et les animaux seront euthanasiés si la tumeur atteint 1 cm³. Les procédures expérimentales susceptibles d'entraîner une souffrance ou une angoisse pour l'animal sont réalisées sous anesthésie.

16723 L'apnée obstructive du sommeil (AOS) provoque une hypoxie chronique intermittente. Ce stress hypoxique répété a de multiples conséquences délétères au niveau cardio métabolique : augmentation des maladies cardiovasculaires et métaboliques (infarctus, diabète de type 2) encore mal comprises.

Ceci conduit à des changements de l'expression de certains gènes sensibles au taux cellulaire d'oxygène. Nous faisons l'hypothèse que ces adaptations provoquent un dérèglement des gènes de l'horloge biologique ayant eux-mêmes des conséquences sur le développement des physiopathologies associées à l'AOS (désordres métaboliques hépatiques).

L'objectif de ce travail est donc d'étudier les effets et les conséquences d'une hypoxie intermittente (HI) sur les dérèglements de l'horloge biologique en s'intéressant pour commencer au foie, étant donné qu'il joue un rôle central dans le métabolisme.

Pour cela, nous proposons d'exposer des souris à l'hypoxie intermittente pendant une durée variable de 2 à 16 semaines et d'analyser dans le détail les conséquences hépatiques du dérèglement des gènes de l'horloge biologique.

Dans une étude préliminaire, des souris non transgéniques seront répartis en 2 groupes. Une moitié d'entre eux sera exposée à l'HI (grâce à un dispositif permettant de changer le taux d'oxygène dans les cages des animaux). Dans chacun de ces groupes, des animaux seront analysés à différents temps de la journée (toutes les 4h) après 2/4/8 et 16 semaines d'exposition à l'hypoxie. Sur le foie, nous réaliserons des analyses d'expression de gènes et du métabolisme. L'ensemble des données seront analysées par bio-informatique afin de les exploiter au maximum. Les autres organes (cœur, reins, muscles, tissus adipeux) seront congelés et stockés pour des analyses a posteriori. Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude, a été évalué par un test statistique tenant compte de la variabilité de précédente expérience. Au total, nous prévoyons d'utiliser 384 animaux pour cette première étude.

Pour confirmer les mécanismes cellulaires impliquant les gènes de l'horloge biologique, nous reproduirons l'ensemble de l'étude à un temps court et à un temps long d'exposition à l'hypoxie (défini

selon les résultats de l'étude préliminaire) avec des animaux dont ces gènes ont été délétés spécifiquement dans le foie. Ainsi s'ajoutent 2 fois 192 animaux transgéniques et autant de leurs contrôles respectifs.

Au final nous utiliserons donc 384 souris non transgéniques, 384 souris transgéniques et 384 souris contrôles soit 1152 animaux sur 4 ans pour cette partie de l'étude de biologie moléculaire.

En parallèle de cette étude de biologie moléculaire, s'ajoute une étude complète de suivi des animaux vigile à l'aide de la télémétrie. Pour cela, 10 animaux par groupe (groupe exposé à l'HI versus groupe non exposé) seront équipés de capteur permettant de transmettre leur activité (mouvement, prise alimentaire) et leur glycémie. Ces informations précieuses viendront compléter le phénotypage des animaux aux différents temps d'exposition à l'hypoxie. Malheureusement, la durée de vie des implants ne dépassant pas 8 semaines, nous devons faire deux lots d'animaux pour couvrir l'ensemble de l'étude. Aussi, les études de biologie moléculaire ne peuvent pas être réalisées sur les mêmes animaux que ceux de la télémétrie car la chirurgie interfère et modifie certains paramètres étudiés. Pour cette analyse de télémétrie, nous utiliserons par séquence 20 animaux non transgéniques, 2 fois 20 animaux transgéniques et 2 fois 20 animaux contrôles, soit 100 souris. 2 séquences seront réalisées (2 à 8 semaines et 9 à 16 semaines), soit 200 souris. Pour cette analyse de télémétrie, 30 animaux d'essais de chirurgie seront également nécessaires. Nous aurons donc besoin de $200 + 30 = 230$ animaux.

Le bilan global du besoin en animaux du projet s'élève donc à 1382.

Les cœurs et les muscles squelettiques des animaux qui ne seront pas utilisés dans cette étude, seront mis à disposition d'autres membres du laboratoire pour des tests.

Nous avons pris en compte la règle des 3 R car ces expérimentations seront réalisées avec le souci de remplacer l'expérimentation animale. Seulement à ce jour aucun moyen ne nous permet de remplacer ce modèle animal pour analyser les dérèglements des gènes de l'horloge biologique. Par contre, nous réduisons le nombre d'expérience en multipliant les tests à partir d'un seul animal (plusieurs techniques d'approches) aussi la télémétrie permet l'obtention de données massives de manière non invasive. Nous raffinons aussi l'expérimentation grâce à la même stratégie, à savoir une multitude d'analyses sur un même animal en partageant les organes. La stratégie adoptée dans cette étude augmente la pertinence scientifique des résultats obtenus. Sa force statistique est aussi plus robuste et permet de limiter le nombre d'animaux. Enfin, cette étude est menée avec un grand souci de raffinement d'autant que ces études sont très sensibles aux moindres perturbations des animaux. Ainsi nous veillerons à respecter scrupuleusement les cycles jours/nuit et limiterons fortement les allers et venues dans l'animalerie pour ne pas déranger les animaux. De plus, l'utilisation d'analgésique et d'antalgique pour les chirurgies satisfait également le cahier des charges en termes de qualité et de raffinement de l'étude.

A terme, l'objectif est d'identifier une cible thérapeutique permettant de limiter les effets délétères de l'HI sur le développement de la maladie du foie via le dérèglement des gènes de l'horloge biologique.

16724 Le Psoriasis est une maladie de la peau qui affecte 2% de la population mondiale caractérisée par une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et une inflammation de la peau. Les processus responsables du déclenchement du psoriasis restent peu connus. Cette demande de projet fait suite à une étude dans laquelle nous avons identifié de nouveaux acteurs (molécules) de la pathogénèse de cette maladie grâce à un modèle chez la souris mimant le psoriasis. De plus, nous avons montré que ces acteurs étaient également induits chez les patients humains atteints par cette maladie.

Afin de déterminer si ces molécules peuvent constituer des cibles thérapeutiques, nous souhaitons induire une inflammation de la peau similaire à celle observée dans le psoriasis, chez des souris mutées, par une application cutanée d'Aldara. L'Aldara est une crème utilisée chez l'Homme pour le traitement de différentes maladies de la peau, dont le principe actif est l'imiquimod, un ligand de récepteurs cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire. L'imiquimod est un modificateur de la réponse immunitaire. Appliquée sur une peau saine, cette crème déclenche une inflammation similaire à celle observée dans le psoriasis. Dans l'espoir d'améliorer les traitements existants, une partie du projet consistera en l'application de molécules présentant un potentiel thérapeutique chez les animaux traités.

L'Aldara et les molécules d'intérêts seront appliqués au niveau de l'oreille des animaux une fois par jour, puis les échantillons seront collectés après 5 jours de traitement. La réponse immunitaire sera caractérisée. Ce projet nous permettra d'identifier les événements impliqués dans les différentes phases de la réponse immunitaire et de déterminer l'effet des molécules d'intérêts. Nous analyserons l'expression des gènes et les cellules présentes au niveau de l'épiderme et du derme de l'oreille, ainsi que dans les ganglions drainants.

Remplacement: les molécules pouvant présenter un potentiel thérapeutique ont été sélectionnées grâce à des tests *in vitro* de cultures cellulaires de souris et humaines. Les cibles ont été déterminées par des analyses chez des patients atteints de psoriasis et ces résultats ont été confirmés par des tests *in vitro* et *ex vivo* de culture d'épiderme de souris. Néanmoins, les phénomènes à l'oeuvre dans ces réactions immunitaires mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour confirmer nos résultats, comprendre cette réponse inflammatoire et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un maximum de 204 souris afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaire. Ces animaux seront répartis dans les différentes phases du projet afin de (1) tester de nouveaux traitements thérapeutiques, (2) caractériser le rôle des nouveaux acteurs identifiés, et (3) étudier les mécanismes d'action des traitements. L'effectif par groupe sera de 8 animaux qui est l'effectif minimal qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement: l'administration de l'imiquimod se fait par application cutanée effectuée sous anesthésie gazeuse légère. Durant le protocole, la surveillance s'effectue tous les jours. Au jour 5, les oreilles des animaux présentent une inflammation modérée se traduisant par une rougeur et un gonflement qui n'altèrent pas le comportement des souris (peu de signes de démangeaison par exemple). Néanmoins, si des lésions devaient apparaître au niveau des oreilles, par exemple du fait de grattements intempestifs, l'animal sera retiré de l'étude et bénéficiera de soins adéquats.

16725 Contexte scientifique : Notre projet a trait à l'étude du rôle du stress dans des cancers. Plus précisément nous nous intéressons à la transmission de génération en génération du stress par des phénomènes qui ne sont pas dû au programme génétique mais a d'autre facteurs. Cet ensemble de phénomènes s'appelle l'épigénétique. La démonstration a été faite qu'un stress chez notre modèle animal de prédilection, la souris, peut se transmettre sur 2 générations grâce à ces mécanismes épigénétiques. En parallèle à cette démonstration de nombreuses équipes ont démontré que certains stress avaient une action promotrice sur le développement de tumeurs.

Descriptions des objectifs du projet : La question à laquelle nous souhaitons répondre est : est-ce que des informations environnementales stressantes peuvent être transmises d'une génération à la suivante et promouvoir la croissance tumorale ? Les retombées attendues sont importantes d'un point de vue scientifique puisque cette démonstration n'a pas été faite, mais aussi au niveau clinique pour la prise en charge de patients dont les ascendants auront subi des expériences traumatiques. Egalement dans la pratique même de l'expérimentation animale où ces paramètres environnementaux ne sont pas connus ni donc pris en compte. Nous nous proposons pour cela de faire suivre à des souris des expériences stressantes, puis de les mettre en accouplement et de réaliser sur leurs descendances des inoculations de cellules tumorales par voie sous cutanée. Les tumeurs seront mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. La comparaison de ces mesures avec celles d'un lot de souris témoins dont les parents n'ont pas subi de stress devrait confirmer ou infirmer notre hypothèse de travail. La bonne santé des animaux sera évaluée tout le long de l'expérimentation selon la législation actuelle. Une fois l'effet sur la croissance observée 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. A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives suffisamment prédictives pour mimer le processus que nous souhaitons étudier. 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'homologie 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 20 ans d'expérience 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 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 : A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives suffisamment prédictives pour mimer le processus complexe 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. Pour réaliser l'ensemble de nos expériences nous demandons l'utilisation de 198 souris.

16726 La dermatite de contact est une éruption cutanée localisée ou une irritation de la peau provoquée par le contact avec une substance étrangère. Les patients présentent une inflammation de la peau avec notamment une infiltration de cellules immunitaires, et des niveaux d'anticorps anormaux dans le sang. Afin de mimer cette maladie, nous utilisons un modèle de souris d'hypersensibilité de contact générant une dermatite allergique de contact par l'application cutanée d'une substance spécifique qui provoque cette allergie.

Dans ce projet, nous souhaitons utiliser ce modèle de dermatite allergique de contact chez des souris mutées pour des gènes d'intérêts qui pourraient représenter des cibles thérapeutiques. Ces animaux seront dans un premier temps sensibilisés via l'application d'une substance spécifique au niveau de la peau de l'abdomen, puis 6 jours plus tard, cette même substance sera appliquée au niveau de la peau de l'oreille. Vingt-quatre heures plus tard, l'épaisseur de l'oreille sera mesurée pour évaluer le gonflement de la peau, puis les échantillons seront collectés et la réponse immunitaire sera caractérisée au niveau cellulaire et moléculaire. Nous analyserons en particulier l'épaississement de l'épiderme et l'infiltration des cellules immunitaires au niveau des oreilles des animaux, dans l'espoir d'identifier si l'absence de certains gènes aboutit à une diminution de la réaction allergique.

Remplacement: Les phénomènes à l'oeuvre dans cette réaction immunitaire nécessitent deux phases distinctes, de sensibilisation et de déclenchement, et mettent en jeu différents organes et plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour comprendre cette réponse inflammatoire et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 8 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules dans la réponse immunitaire. Chaque lignée sera constituée de douze animaux transgéniques et douze animaux contrôles, pour un total de 192 animaux. Cet effectif est l'effectif minimal par lignée qui nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement: l'administration de la substance se fait par application cutanée, ce qui nécessite une anesthésie gazeuse légère. Cette application peut être accompagnée de légères démangeaisons qui s'estompent quelques heures après le traitement. La surveillance des animaux aura lieu tous les jours durant la phase de sensibilisation, puis tous les 3 jours jusqu'à la phase de ré-exposition à la substance. La surveillance sera visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, de sa posture et de son comportement. D'après notre expérience, aucun dommage important n'est attendu chez ces animaux, néanmoins si un animal présente un dos vouté, un pelage hérissé ou est inactif après stimulation, il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure/lésion importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement.

16727 Ce projet vise à comprendre les déficits cognitifs associés aux maladies neuro-développementales telles que l'autisme ou la schizophrénie, dans l'objectif de les réduire.

Parmi les gènes ayant été identifiés comme liés à l'apparition de troubles neuro-développementaux, le Récepteur à la Neurokinine 3 (NK3R), dont l'expression est altérée chez les patients, a fait l'objet

d'essais cliniques peu concluant chez l'adulte. Cependant, des résultats préliminaires dans notre laboratoire ont montré un patron d'expression spécifique durant le développement précoce (voir figure projet), nous avons donc fait l'hypothèse que NK3R était impliqué dans la maturation cérébrale, et ce au tout début de la vie. L'absence d'efficacité des traitements chez l'adulte serait donc due au fait que la fenêtre d'intervention se trouverait au cours du développement. Du point de vue fonctionnel, NK3R a été impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémoire, mais son rôle précis dans le fonctionnement neuronal reste à définir. D'autre part, les déficits cognitifs liés aux maladies neuro-développementales sont assez peu étudiées en comparaison avec les atteintes des comportements sociaux ou des troubles obsessionnels-compulsifs.

Afin d'adresser ces deux questions, ce projet s'articulera autour de deux axes : comprendre le rôle de NK3R dans le fonctionnement cérébral au cours du développement, et intervenir sur ce récepteur au moment du développement précoce, afin de prévenir l'apparition des déficits cognitifs identifiés dans des modèles de désordres neuro-développementaux.

Cette étude sollicite des tâches comportementales permettant de modéliser deux types de mémoire particulièrement affectés dans les maladies psychiatriques. Les animaux utilisés dans cette étude seront donc des souris au nombre de 1506 issues d'un centre d'élevage agréé.

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 les appareils comportementaux 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 à honorer les deux autres points qui sont le raffinement et la réduction. Dans notre cas, la première approche corrélatrice vise à réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser dans la deuxième approche qui est plus longue et plus complexe à mettre en place. Nous utiliserons à la fois des mâles et les femelles, si nous ne détectons pas d'effet du genre, nos groupes expérimentaux seront alors divisés par 2.

En ce qui concerne le Raffinement, la réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés et sensibilisés aux questions d'éthiques et de bien-être animal. Les animaux sont suivis tous les jours afin de vérifier leur état général et la vétérinaire est contactée en cas de blessure ou de comportement anormal. Nous prévoyons des pièces d'hébergement proche des lieux d'expérimentation, afin de réduire le stress général de nos animaux, ainsi que des périodes d'acclimatation à toute nouvelle pièce. Les animaux en cages individuelles auront plus de coton dans les cages afin de pouvoir se construire un nid confortable. Enfin, les animaux subissant des chirurgies feront l'objet d'un suivi attentif et d'administration de médicaments pour gérer la douleur le cas échéant. Le présent dossier démontre par la suite la conformité des expérimentations envisagées qui se feront en complète adéquation avec la nouvelle directive européenne.

16728 Les vols spatiaux correspondent à une combinaison unique de stress qui a un impact négatif sur de nombreux systèmes physiologiques. Ainsi, les études réalisées sur les humains et les animaux ayant séjourné dans l'espace montrent que cet environnement extrême affecte les systèmes musculo-squelettique, vasculaire, cognitif et immunitaire.

Étant donné le peu de protocoles expérimentaux pouvant être réalisés sur des astronautes, le nombre réduit de ces derniers et des missions spatiales, divers modèles ont été développés pour modifier la gravité en laboratoire et ainsi comprendre comment de telles modifications affectent diverses fonctions physiologiques. Parmi ces modèles, l'exposition à un environnement hypergravitaire via l'utilisation d'un rotor est une méthode classiquement utilisée. Dans ce cadre, des grenouilles (*Xenopus laevis* et

Xenopus tropicalis) et des salamandres (Pleurodeles waltl et Ambystoma mexicanum) adultes, achetés chez un fournisseur agréé, seront acclimatés durant 2 semaines dans des enceintes aquatiques où ils bénéficieront d'un enrichissement (présence de morceaux de tuyau en PVC afin qu'ils puissent s'y cacher). Ils seront ensuite utilisés afin de produire sur place des embryons/têtards qui seront soumis, via des rotors, à différents niveaux d'hypergravité (4 ou 5G) 24h/24H durant 3 à 4 semaines. Les embryons/têtards pourront également provenir de collaborateurs à la condition qu'ils soient intégrés à une autorisation de projet de ces collaborateurs. Par session expérimentale, 16 à 120 embryons ou 16 à 32 têtards, seront répartis dans les huit aquariums d'un rotor afin que leur développement ait lieu en hypergravité. Le même nombre d'embryons/têtards sera réparti dans huit aquariums identiques mais non soumis à une modification de la gravité (groupe contrôle). Ces nombres ont été déterminés pour permettre d'avoir suffisamment d'animaux en fin d'expérience pour analyser de nombreux paramètres moléculaires et cellulaires et obtenir une puissance statistique suffisante pour obtenir des résultats significatifs (Réduction). Les animaux seront analysés soit immédiatement après l'arrêt du rotor, soit après une phase de récupération d'une durée maximale de 4 semaines, afin de savoir respectivement, comment une modification de la force gravitaire affecte leur développement, et/ou combien de temps il faut pour un retour à la normale. Un maximum de cinq sessions d'exposition à l'hypergravité par an est prévu sur des lots d'embryons/têtards différents. Pour ces études, il n'est pas possible d'avoir recours à des modèles cellulaires ou moléculaires car la réponse globale de l'individu est nécessaire (Remplacement non envisageable).

L'objet de la présente saisine est donc d'obtenir un agrément pour réaliser au maximum 5 sessions expérimentales par an sur des embryons/têtards issus d'une de ces 4 espèces d'Amphibiens en utilisant des protocoles standards validés par la communauté scientifique internationale (Raffinement). Ces 4 espèces sont proposées car la vitesse de développement de leurs embryons est différente ce qui permettra d'étudier les effets de l'hypergravité sur les stades précoces (avec P. waltl ou A. mexicanum) ou tardifs (avec X. laevis ou X. tropicalis) du développement animal. Le nombre d'animaux utilisés par session sera de 6 femelles adultes, 6 mâles adultes et maximum 240 embryons ou maximum 64 têtards, soit un maximum de 1260 animaux par an (30 femelles adultes, 30 mâles adultes et 1200 embryons ou 320 têtards) et de 6300 animaux sur 5 ans (150 femelles adultes, 150 mâles adultes et 6000 embryons ou 1600 têtards). Les 2 procédures correspondent à « Production d'embryons par fécondation *in vitro* » et « Exposition d'embryons d'Amphibiens à l'hypergravité (4 ou 5G) »

Condition d'hébergements : Pendant la session, les embryons/têtards d'Amphibiens pourront être hébergés dans un des deux rotors disponibles.

Le premier possède 8 nacelles, chacune accueillant un aquarium contenant 0,5L d'eau. Pendant l'exposition à l'hypergravité, les embryons/têtards sont placés à une densité de 4 à 15 par aquarium en fonction de leur stade de développement (4 au stade 50 ce qui correspond à des têtards de 2 cm de long ; 15 au stade embryonnaire précoce appelé blastula). L'aération des aquariums, via des bulleurs, et la distribution de nourriture, via un système de distribution automatique, sont pilotés par ordinateur et les embryons sont surveillés par des caméras (une caméra par nacelle) fonctionnant aussi bien en visible qu'en infrarouge. Les conditions de température, d'éclairage (alternance classique jour/nuit de 12h/24h) et de ventilation de la pièce sont contrôlées au niveau de la pièce de l'animalerie. Le niveau d'eau est vérifié tous les 2 jours et celle perdue par évaporation est remplacée.

Le second permet d'accueillir 8 miniaquariums développés pour permettre le développement d'embryons d'Amphibiens à bord de la Station Spatiale Internationale (ISS). Chaque miniaquarium a une contenance de 64 mL d'eau. Deux embryons au stade blastula peuvent être placés dans chaque miniaquarium. L'aération est assurée par des membranes perméables à l'oxygène et au gaz carbonique. Ces membranes, imperméables pour l'eau évitent les pertes par évaporation. De plus, chaque aquarium dispose d'une circulation d'eau assurée par une pompe pilotée par ordinateur qui permet l'élimination des déchets via le passage de l'eau dans un filtre à charbon actif. Quant à la nourriture, elle est progressivement fournie aux animaux de chaque miniaquarium à partir d'un réservoir piloté par une pompe osmotique. Ici, la surveillance des animaux est visuelle et assurée quotidiennement. A nouveau, les conditions de température, d'éclairage et de ventilation de la pièce sont contrôlées au niveau de la pièce de l'animalerie.

La température (20°C pour *X. laevis* et *P. waltl*, 24°C pour *X. tropicalis*, 18°C pour *A. mexicanum*) et la qualité de l'eau (pH, nitrites, nitrates...) sont contrôlées deux fois par semaine.

Points limites : Les points limites menant à l'exclusion et à la mise à mort (par surdose d'anesthésique dans l'eau) des adultes sont : léthargie ; inconscience ; immobilité ; mauvais état de la peau ; hémorragie ; position anormale ; réduction de la mobilité.

Les points limites menant à l'exclusion et à la mise à mort (par surdose d'anesthésique dans l'eau) des têtards sont : mauvais état de la peau ; position anormale ; réduction de la mobilité.

16729 Les maladies atopiques, incluant la dermatite atopique (également appelée eczéma), l'asthme, la rhinite allergique et les allergies alimentaires, sont des maladies inflammatoires complexes, impliquant différents sites du corps, avec des caractéristiques communes. Le terme "marche atopique" fait référence à la séquence naturelle des manifestations atopiques, qui montre que la dermatite atopique précède le développement des autres maladies atopiques, et que la sévérité de la dermatite atopique influence le cours de l'allergie respiratoire. Une meilleure compréhension des mécanismes de la marche atopique est cruciale afin de développer des stratégies de préventions efficaces et le traitement des maladies atopiques.

Nous avons développé dans notre laboratoire un modèle murin mimant les caractéristiques de la marche atopique mettant en oeuvre une rupture mécanique de la barrière cutanée suivie de l'application d'un allergène (l'ovalbumine). Afin de raffiner ce protocole, nous souhaiterions tester une nouvelle technologie permettant de générer des micropores dans l'épiderme. Cette technologie est quasi indolore et est utilisée dans la sphère médicale. La génération des micropores sera suivie de l'application de l'ovalbumine afin de générer une dermatite atopique et de provoquer une sensibilisation de l'animal à l'ovalbumine. Trois semaines après la sensibilisation, nous allons effectuer des instillations intra-nasales d'ovalbumine, pour générer une réponse allergique au niveau des poumons des animaux, similaire à un phénomène asthmatique.

Une analyse de différents paramètres de la réaction immunitaire sera effectuée après la sensibilisation des animaux. Un autre groupe d'animaux sera analysé après la génération de l'asthme expérimental: les mesures seront alors effectuées au niveau des poumons. Ce protocole expérimental d'induction d'un phénomène de marche atopique sera appliqué à 5 lignées de souris génétiquement modifiées afin de caractériser les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaire. Nous espérons identifier ainsi des cibles thérapeutiques potentielles qui permettraient de prévenir le phénomène de marche atopique.

Remplacement: Les phénomènes à l'oeuvre dans la marche atopique mettent en jeu différents organes et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour comprendre ce phénomène et identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 5 lignées de souris génétiquement modifiées afin d'identifier les rôles de différentes molécules et cellules de la réponse immunitaire pour un nombre maximal de 513 animaux. Cet effectif nous permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différentes phases de la réponse allergique étudiées et pour les différents paramètres mesurés.

Raffinement: La rupture de la barrière épidermique par génération de micropores est quasiment indolore et ce qui constitue donc un raffinement important en comparaison de la méthode traditionnelle nécessitant des applications successives de ruban adhésif. L'application topique de l'ovalbumine nécessite simplement une anesthésie gazeuse légère. L'instillation intra-nasale de l'allergène s'effectue sous anesthésie générale légère, ce qui nécessite une injection intra-péritonéale de la solution d'anesthésie. Après l'instillation, les animaux dorment durant une quinzaine de minutes, allongés sur le dos sur un plan incliné, et sont surveillés jusqu'au réveil. La surveillance des animaux aura lieu tous les deux jours durant la phase de sensibilisation, et tous les jours durant la phase de challenge. La surveillance sera dans un premier temps visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, sa posture et son comportement. Si l'animal présente un dos vouté, un pelage hérissé ou est inactif après stimulation, il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement.

16730 Le tissu adipeux est un organe qui produit une multitude de facteurs qui se diffusent par le sang et peuvent avoir des effets dans tout l'organisme. Les personnes obèses souffrent d'une augmentation de la masse de leur tissu adipeux. Cette augmentation ne se produit pas seulement dans les sites classiques du tissu adipeux, mais également dans des sites périphériques, à l'extérieur et à l'intérieur d'organes non spécialisés dans le stockage du gras comme les muscles. L'infiltration de tissu adipeux dans le muscle modifie la composition cellulaire et la structure de ce tissu, et par conséquent l'environnement dans lequel résident les cellules souches musculaires.

L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle des nidogènes (Nid), des molécules produites en grande quantité par le tissu adipeux et donc présentes dans l'environnement des cellules souches musculaires. Plus précisément, nous souhaitons étudier comment des cellules nommées FAPs, capables de se transformer en cellules graisseuses, affectent la fonction des cellules souches musculaires au cours de la réparation du muscle après une blessure et le rôle des nidogènes dans ce processus.

Nos résultats antérieurs en culture ont montré une augmentation de la présence des nidogènes dans le muscle lors de l'obésité ainsi qu'une augmentation de la production de Nid-1 et Nid-2 par les FAPs.

L'environnement cellulaire musculaire ne peut pas être reconstitué *in vitro* en raison du grand nombre de cellules qui le composent, il est donc nécessaire d'utiliser des modèles animaux pour pouvoir étudier les interactions cellulaires au sein du muscle entier. Nous proposons 4 approches méthodologiques qui nous aideront à connaître la fonction des nidogènes et des FAPs au cours du processus de réparation musculaire dans des modèles développés chez la souris. Nous utiliserons notamment deux méthodes différentes pour augmenter de façon artificielle l'expression des nidogènes musculaires afin d'en comprendre les effets dans un muscle normal ou blessé. Nous utiliserons les greffes de FAPs surexprimant des nidogènes dans des souris exposées à des lésions musculaires afin d'étudier le rôle des nidogènes produits par les FAPs. Enfin, un modèle d'obésité engendrée par un régime riche en graisse nous permettra d'obtenir des FAPs que nous pourrions greffer afin d'étudier les modifications de leur fonction physiologique entraînée par l'obésité et l'impact sur les cellules souches musculaires notamment au cours du processus de réparation après une blessure.

Pour limiter le stress et la douleur, toutes nos expérimentations seront pratiquées sous anesthésie générale et sous analgésie. Le modèle de lésion musculaire et les greffes cellulaires sont parfaitement maîtrisés au laboratoire et effectués par du personnel qualifié. Le bien-être des animaux sera vérifié de façon bi-quotidienne, leur milieu sera enrichi et l'accès à la nourriture et à l'eau sera facilité si nécessaire. Les animaux seront acclimatés une semaine avant d'être utilisés et lorsque cela sera possible les procédures utiliseront les mêmes contrôles. Les études *in vitro* préalables décrites ci-dessus nous ont permis de choisir les cibles moléculaires d'intérêt que nous proposons d'étudier. Les différents temps d'étude de la régénération (J2, J7 et J28) seront être réalisés de façon décalée dans le temps ainsi si nous n'observons pas d'effet sur le temps J2, il sera possible de ne pas faire les temps suivants J7 et J28 afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et de revoir le protocole.

L'ensemble des procédures nécessitera au plus 198 animaux.

16731 Les maladies atopiques, incluant la dermatite atopique (également appelée eczéma), l'asthme, la rhinite allergique et les allergies alimentaires, sont des maladies inflammatoires complexes, impliquant différents sites du corps, avec des caractéristiques communes. Le terme "marche atopique" fait référence à la séquence naturelle des manifestations atopiques, qui montre que la dermatite atopique précède le développement des autres maladies atopiques, et que la sévérité de la dermatite atopique influence le cours de l'allergie respiratoire. Une meilleure compréhension des mécanismes de la marche atopique est cruciale afin de développer des stratégies de prévention et de nouveaux traitements des maladies atopiques.

Nous nous intéressons au rôle de l'environnement dans la peau au cours de la dermatite atopique et comment les molécules produites peuvent influencer le type d'asthme développé plus tard. Pour étudier ces molécules, nous avons mis au point dans notre laboratoire un modèle mimant les caractéristiques de la marche atopique chez la souris. Dans ce modèle, nous utilisons une technologie permettant de générer des micropores dans la peau (technique également utilisée chez l'Homme dans la sphère médicale) puis nous appliquons un allergène (poussières d'acariens) sur la peau de souris. Cette étape

engendre une dermatite atopique liée à une réponse immunitaire caractéristique des allergies, et provoque une sensibilisation de la souris aux poussières d'acariens. Nous avons la possibilité de modifier la profondeur des micropores et donc les molécules produites dans la peau. Deux semaines après le début de la sensibilisation, nous allons réexposer les souris aux poussières d'acariens au niveau des poumons, ce qui va entraîner une réponse allergique similaire à un phénomène asthmatique. Nous caractériserons cette réponse par une analyse de la peau et des poumons, afin de mieux comprendre les mécanismes de la marche atopique. Ce protocole sera également appliqué à des souris génétiquement modifiées pour permettre la caractérisation des différentes cellules et molécules au cours de la marche atopique

De plus, nous appliquerons ce protocole à deux modèles de souris reproduisant des maladies humaines pour étudier le rôle des molécules précédemment caractérisées dans un environnement plus complexe et déterminer si elles pourraient être des cibles thérapeutiques. Ces modèles pourraient également permettre d'identifier de nouvelles molécules importantes dans la marche atopique.

Remplacement: Les lignées de souris génétiquement modifiées utilisées dans ce projet vont nous permettre d'inactiver certaines cellules ou certains gènes, dont l'implication dans la réponse immunitaire allergique a été suggérée *in vitro* par d'autres équipes de recherche. De plus, les phénomènes à l'oeuvre dans la marche atopique mettent en jeu différents organes (poumons, peau, ganglions) et des réseaux impliquant plusieurs types cellulaires interagissant ensemble. Cette complexité rend nécessaire l'utilisation d'expériences *in vivo* pour confirmer et approfondir ces résultats, pour comprendre les processus responsables de la marche atopique et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Réduction: Ce protocole sera appliqué à un total de 420 souris pour identifier le rôle de différentes molécules dans la marche atopique. L'effectif minimal par groupe est 12 animaux, ce qui permettra d'avoir des résultats statistiquement interprétables pour les différents paramètres mesurés, et de conclure quant au rôle des cellules et des signaux cellulaires étudiés dans la marche atopique. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, nous aurons une phase exploratoire qui permettra de déterminer les 2 conditions optimales parmi un plus grand nombre. Nos expériences se feront ensuite selon les 2 conditions sélectionnées, ce qui permettra de restreindre et cibler les expériences les plus pertinentes et donc de limiter le nombre d'animaux utilisés par la suite.

Raffinement: La rupture de la barrière épidermique par génération de micropores est peu douloureuse, cette méthode est utilisée dans la sphère médicale. L'application topique d'acariens et l'instillation intra-nasale d'acariens nécessitent une anesthésie gazeuse légère et une anesthésie générale légère respectivement. Après ces manipulations, les animaux seront placés sur une plaque chauffante et seront surveillés jusqu'au réveil. Tout au long du protocole, la surveillance des animaux aura lieu tous les 3 jours durant la phase de sensibilisation, et tous les jours durant la phase de réexposition aux acariens au niveau des poumons par instillations intra-nasales. La surveillance sera visuelle, avec un suivi de l'aspect général de l'animal, de sa posture et de son comportement. Si l'animal présente un dos vouté, un pelage hérissé, est inactif après stimulation, ou si les points d'injections présentent des signes d'infection ou d'inflammation, il sera retiré de l'étude et pourra bénéficier de soins après l'avis du vétérinaire. Si le cas est plus grave (blessure importante par exemple), l'animal sera euthanasié immédiatement

16732 Le mélanome malin, survenant à partir des mélanocytes, est un cancer de la peau très dangereux, et présente une forte tendance à générer des métastases. Il est reconnu que les cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement des tumeurs non seulement échouent à générer une réponse anti-tumorale efficace, mais interagissent également avec les cellules malades pour promouvoir l'expansion et l'invasion des tumeurs. Chez l'Homme, il existe plusieurs types de réponses immunitaires. La catégorie du pronostic est influencée par le type de réponse immunitaire à l'oeuvre pour lutter contre l'invasion cancéreuse. Il est actuellement suggéré qu'une réponse immunitaire dite "de type 2" dans le microenvironnement de la tumeur est associée à un mauvais pronostic comparé au tumeur chez lesquelles une réponse "de type 1" est prédominante.

Lors d'études précédentes, notre laboratoire a identifié une molécule (thymic stromal lymphopoietin (TSLP)), produite par les kératinocytes de la peau, suffisante et nécessaire pour induire une réaction

inflammatoire de type 2. Ce type de réponse immunitaire est impliquée notamment dans les dermatites atopiques (eczéma), et dans l'asthme. Récemment, une fonction nouvelle et inattendue de cette molécule a été découverte: l'induction et la régulation de plusieurs variétés de tumeurs, même si plusieurs de ces résultats restent sujet à controverse.

Notre laboratoire a généré des modèles murins permettant soit d'inactiver le gène codant pour TSLP, soit de forcer l'activation ce gène. Afin d'étudier les rôles de TSLP dans la tumorigénèse du mélanome, nous allons inoculer des cellules d'une lignée cellulaire issue d'un mélanome à ces souris. Nous pourrons alors comparer la croissance et la progression des tumeurs dans ces lignées murines et vérifier si l'inactivation ou l'activation de TSLP peut modifier ces paramètres. Ce projet pourrait ainsi aboutir à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour combattre ce type de cancer.

Remplacement: les lignées de souris n'exprimant pas TSLP, soit dans tous les tissus soit dans les kératinocytes de la peau, permettent d'étudier le rôle de cette molécule dans différentes maladies, et notamment dans le microenvironnement tumoral. Actuellement, il n'existe pas de modèle *in vitro* capable de reproduire ce type d'environnement.

Réduction: Afin de différencier les rôles de différentes molécules pouvant être impliquées dans le développement des mélanomes, ce projet va nécessiter l'utilisation de 5 lignées de souris composées chacune de 12 animaux. De plus, nous souhaitons analyser l'établissement des métastases pour 2 de ces lignées, sur des groupes composés de 15 animaux. Ce projet nécessitera donc l'utilisation d'un maximum de 90 animaux. Ce nombre d'animaux nous permettra d'obtenir des conclusions statistiquement significatives quant à l'accroissement ou à la diminution des tumeurs et à l'établissement des métastases.

Raffinement: après l'injection des cellules, le suivi des animaux sera effectué deux fois par semaine. Les animaux seront euthanasiés si la tumeur atteint 1 cm³ ou 30 jours après l'injection. Le diamètre des tumeurs sera mesuré avec un pied à coulisse. Les animaux seront pesés 2 fois par semaine, l'évolution du poids de la tumeur sera estimée afin de ne pas interférer avec la mesure du poids des animaux. Une attention particulière sera portée au niveau du site d'injection et les tumeurs seront attentivement observées. En cas de diminution du poids de l'animal supérieurs à 20%, si des signes de nécrose de la tumeur sur une durée supérieure à 72 heures, et si des signes de douleur (observation de l'expression faciale des animaux) ou d'altération de l'activité ou des problèmes de pelage sont observés (ou en cas de combinaison de ces différents paramètres), l'animal sera euthanasié.

16733 Depuis les années 80, des équipes d'ingénieurs tentent de développer des robots permettant d'automatiser ou de faciliter les chirurgies. A la fin des années 90, Un robot multichirurgies a permis pour la première fois d'assister l'Homme pour effectuer un pontage coronarien. Depuis cette première mondiale, les efforts des ingénieurs sont mis dans la conception de robots chirurgicaux spécialisés dans un type de chirurgie permettant ainsi des interventions complexes dans des zones difficiles d'accès du corps humain. Ceci constituerait un avantage non négligeable, puisque du point de vue du chirurgien, cela leurs confèrera une dextérité, une visibilité, une précision, une reproductibilité et une liberté de mouvements plus satisfaisantes. 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.

Dans le cas de cette étude nous voudrions, valider un bras robotisé conçu pour la chirurgie vitréo-rétinienne. Cela comprend diverses interventions touchant à la rétine et à la cavité vitrénienne 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.

Après avoir testé le bras robotisé sur des globes oculaires isolés, l'étape sur animaux vivants est indispensable avant de pouvoir passer aux "first in man". Une première étude sur 6 lapins en février

2020 a permis de mettre en avant les limites de la V1 du bras robotisé en *in vivo* permettant à l'entreprise conceptrice de le modifier et d'y apporter des nouvelles fonctions. Le but de cette nouvelle étude est donc de valider les modifications et les nouvelles fonctionnalités du bras robotisé chirurgical innovant pour la chirurgie rétino-vitréenne qui a été développé par les chirurgiens de notre laboratoire. 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 OEUVRE *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.

16734 Les valves cardiaques sont des structures fibro-élastiques assurant une circulation sanguine unidirectionnelle au cours des cycles de contraction du cœur. Les pathologies touchant ces valves sont de deux types : l'insuffisance avec défaut de fermeture de la valve ou la sténose avec défaut d'ouverture de la valve. La sténose touche essentiellement la valve aortique qui sépare le ventricule gauche de l'aorte. Il s'agit d'une pathologie dont l'origine est le plus souvent dégénérative avec une calcification progressive des feuillets valvulaires augmentant la morbidité et la mortalité de sujets âgés. Plusieurs facteurs cliniques et environnementaux ont été associés à l'apparition de cette pathologie : le tabagisme, l'hypertension, l'hyperlipidémie, l'hypercholestérolémie. Les premières étapes de développement de la calcification de la valve aortique sont très proches de celles conduisant à l'apparition d'athérosclérose et impliquent une lésion endothéliale entraînant une inflammation et une accumulation de lipides oxydés.

Nous avons identifié un nouveau gène X cible du facteur Nfkb de la voie inflammatoire qui est impliqué dans la calcification de la valve et le développement de sténose aortique. Les modèles murins ne développant pas spontanément de lésions d'athérosclérose ou de sténose, nous avons choisi d'étudier un modèle d'inactivation du gène X sur un fond déficient pour le gène ApoE codant pour une glycoprotéine Apolipoprotéine A. Les souris déficientes en ApoE sont des modèles bien caractérisés et fréquemment utilisées pour l'étude du développement de l'athérosclérose. Lorsqu'elles sont nourries par une alimentation riche en graisse pendant 4 à 6 mois (high fat diet, 45% matière grasse), ces souris développent des hypercholestérolémies associées à des plaques d'athérome d'apparition précoce et une fibrose voire une calcification de la valve aortique

Notre étude aura pour objectif de définir l'impact du gène X par invalidation génétique dans le lignage endothélial et par traçage génétique du lignage X sur un fond ApoE invalidé sur l'apparition de calcification de la valve aortique au niveau histologique et moléculaire. Notre projet impliquera l'utilisation de 72 souris durant 1 ans.

Cette étude sera réalisée 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 ; humidité 45-55%, renouvellement d'air : 15 fois/heure ; éclairage artificiel : 12h jour/12h nuit). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par groupe de 3 à 5 animaux dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton ou de papier kraft. Nos souris feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter précocement les points limites de souffrance.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

-Remplacer : l'utilisation de modèles *in vivo* est nécessaire pour analyser le développement des pathologies valvulaire. Il n'existe pas actuellement de modèles *ex vivo* ou *in vitro* permettant de récapituler l'impact du flux sanguin et des factures circulant sur l'apparition de calcification valvulaire.

-Réduire : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence des anomalies des valves.

-Raffiner : afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs seront définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

16735 Dans le système nerveux, les cellules nerveuses ou neurones sont connectées entre elles et communiquent grâce à des molécules appelées neurotransmetteurs. La connexion entre les neurones s'appelle la synapse au niveau de laquelle le neurotransmetteur est libéré et agit comme une clé dans une serrure. En effet, il va pouvoir se fixer sur des molécules capables de le reconnaître, insérées dans la membrane du neurone. Ces molécules sont appelées récepteurs aux neurotransmetteurs. La force de la connexion entre deux neurones n'est pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones connectés. Cette propriété qu'on les synapses de changer leur efficacité est appelée plasticité synaptique. Elle est à la base de nombreuses formes de mémoire simples ou complexes permettant l'adaptation par des changements de comportements en réponse aux changements de l'environnement chez tous les individus présentant un système nerveux, même peu développé. L'étude du fonctionnement des récepteurs et de la plasticité synaptique est donc importante pour comprendre les mécanismes des différents types de mémoires et de leurs perturbations. Notre groupe a montré dans des modèles *in vitro* de neurones de rongeurs en culture que pour pouvoir changer l'efficacité d'une synapse, les récepteurs aux neurotransmetteurs ont des mouvements latéraux très rapides dans la paroi des neurones, ce qui leur permettent d'être sollicités très vite. Il a été montré ainsi qu'en immobilisant les récepteurs avec des molécules particulières (comme des anticorps par exemple), la synapse perdait sa capacité à changer son efficacité et produire une réponse modulée. Il est maintenant important d'évaluer et de comprendre l'effet de l'immobilisation de certains types de récepteurs sur la plasticité synaptique en développant une nouvelle génération d'outils moléculaires, en utilisant un modèle animal proche de l'être humain, la souris. Cette espèce est un mammifère, facile à élever et à reproduire dans des conditions contrôlées, très utilisé en neurosciences pour son cerveau dont l'organisation est proche de celle de l'homme, capable d'apprendre vite des tâches comportementales complexes. Dans ce projet les souris utilisées sont des souris transgéniques sans un phénotype dommageable. Ces souris génétiquement modifiées nous permettent la manipulation des récepteurs afin d'étudier plus en détail l'importance de la mobilisation de certains sous-types de récepteurs sur la plasticité synaptique

Justification du respect de la règle des 3R.

Remplacer: Ce protocole nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, à ce jour il n'existe pas encore de méthodes alternatives à l'étude de l'effet de l'immobilisation des récepteurs dans la plasticité synaptique.

Réduire: Le nombre d'animaux a été calculé par l'estimation de la variance observée avec ce type de donnée afin d'atteindre une signification statistique. Le nombre d'animaux sera de 190 sur 3ans. 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 leurs permettant de reproduire un comportement naturel de fouissage et d'un enrichissement constitué d'un nid végétal et de tubes de cartons leur permettant de construire des nids, 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. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie. Afin de réduire la douleur, les procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie et en présence d'une couverture analgésique. Un suivi post opératoire sera 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.

16736 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, stéroïdes...). 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 biliaires 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 biliaires 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.

16737 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. Le présent projet s'inscrit dans cette dynamique thérapeutique. Notre laboratoire développe un anticorps thérapeutique ciblant les récepteurs KIR (Killer Immunoglobulin-like receptors) qui sont à l'origine de l'inhibition des fonctions effectrices (cytotoxicité et production de cytokines) de lymphocytes NK (Natural Killer) et T CD8. En effet, des signaux inhibiteurs sont induits lorsque les récepteurs KIR interagissent avec leur ligand, les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe I (CMH I). La stratégie thérapeutique développée par notre laboratoire réside dans le blocage de ces interactions par un anticorps, afin de réactiver les fonctions immunes de ces cellules immunes, jouant un rôle crucial dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales. L'objet de cette

étude est d'évaluer les effets de la combinaison du blocage des interactions des KIR avec les molécules de CMH I avec de(s) cytokine(s) immuno-activatrices.

L'effet de(s) cytokine(s) sera évalué dans un test de cytotoxicité *ex vivo* mettant en présence des cellules tumorales et des NK de souris transgéniques ayant été au préalable traitées avec des cytokines, ainsi que dans un modèle de survie à long terme de souris transgéniques greffées par voie intraveineuse avec des lignées tumorales humaines.

Le nombre total d'animaux est évalué au maximum à 928 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 l'effet des cytokines sur la fonction de NK 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.

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 (monoplégie de l'arrière-train), perte de poids supérieure à 15 %, sont des critères qui justifieront le sacrifice des animaux.

16738 Malgré les résultats spectaculaires de l'immunothérapie en cancérologie, de nombreux patients ne répondent pas aux différentes approches thérapeutiques et évoluent vers des formes métastatiques pouvant conduire à la mort. Grâce à nos progrès sur la connaissance de l'infiltrat immunitaire au cours du développement tumoral, nous proposons de tester de nouvelles approches d'immunothérapie visant à renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale.

Dans ce projet, nous allons respecter la règle des 3R.

REPLACEMENT: Il n'existe à ce jour aucune alternative à l'expérimentation animale lorsqu'il s'agit de modéliser les processus complexes de développement de la réponse immunitaire dans un contexte tumoral. Afin d'étudier de nouvelles approches d'immunothérapie, l'utilisation de modèles murins est cruciale.

RAFFINEMENT: Toutes les procédures expérimentales du projet sont réalisées en tenant compte du bien-être animal dans le strict respect des réglementations en vigueur et en étroite collaboration avec la structure du bien-être animale de notre établissement. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les souris afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal être" de l'animal. Une anesthésie générale sera utilisée durant les procédures expérimentales (transplantation de cellules tumorales, injection intraveineuse, prélèvement sanguin, ...). Nous vérifierons l'état de santé des souris quotidiennement : tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques sera relevé et évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort. Durant l'ensemble de l'étude, les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlé : température et ventilation régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie), avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Les souris seront maintenues en groupes de 3 à 5 animaux par cage. L'environnement est enrichi par des dômes en carton ou du coton.

REDUCTION: Basé sur notre expérience antérieure et sur la nécessité d'avoir des tests statistiques robustes pour publier nos travaux et les partager avec la communauté scientifique, le design du projet a été réalisé de façon à répondre à notre objectif avec le nombre minimal nécessaire de souris.

Le nombre d'animaux nécessaires pour le projet de recherche sur 5 ans s'élève à 3400 animaux.

16739 Ce projet se focalise sur les poissons migrateurs (saumon, truite, anguille, lamproies, etc.). Ces espèces emblématiques de la biodiversité des fleuves sont fragilisées par l'action de l'Homme. L'objectif de ce projet est de suivre sur le long terme ces espèces en milieu naturel afin de prévoir l'évolution de ces populations sous l'effet des changements environnementaux (globaux et locaux) qui affectent ces écosystèmes.

Pour ce faire, un certain nombre de rivières, au niveau national et international, ont été retenues comme « rivières index » dont les 3 incluses dans ce projet. Ces suivis se font via des dispositifs de capture ou d'échantillonnages tels que des stations de piégeage et des opérations par pêche scientifique à l'électricité. Ces techniques sont mises en œuvre pour compter et observer ces animaux individuellement afin de recueillir des informations concernant leur taille, poids, sexe, croissance et comportement mais aussi pour prélever des échantillons de tissus afin d'alimenter nos collections et pouvoir réaliser des analyses rétrospectives de génétique par exemple. L'objectif de ces suivis est d'étayer les connaissances sur la biologie et l'écologie de ces populations afin d'appliquer des mesures de gestion, de protection ou de suivis d'exploitation de ces espèces patrimoniales. Ces opérations alimentent des chroniques de données ou des collections longues de plusieurs décennies. Ces informations sont accessibles à l'ensemble des communautés scientifiques concernées et sont également utilisées par les organismes en charges de la gestion et la protection de ces espèces tant au niveau national (OFB-Office Français pour la Biodiversité, ONGs...) qu'européen (rapportages réglementaires, DCF (Data Collection Framework), Conseil International pour l'Exploration de la Mer CIEM, Organisation pour la Conservation du Saumon de l'Atlantique Nord, etc.). Afin de réaliser ces suivis, la manipulation des poissons est nécessaire pour récolter les données morphologiques telles que le poids, la taille ou le sexe. Un prélèvement de quelques écailles et d'un petit morceau de nageoire est également effectué. Pour réaliser ces manipulations dans de bonnes conditions, les animaux sont au préalable anesthésiés. Une partie d'entre eux sont ensuite marqués individuellement. Tous, après réveil, sont remis dans la rivière. Le nombre total d'individus capturés est estimé à 166185 sur la période de 5 ans (calculé sur la moyenne des 10 dernières années sur l'ensemble des sites) pour 32 espèces.

Règle des 3R :

Remplacement : Le remplacement par des modèles de prédiction est impossible car ce sont les suivis réalisés dans ce projet et sur les sites retenus qui permettent d'alimenter les modèles utilisés pour l'ensemble des cours d'eau français concernés.

Réduire : Afin de ne pas capturer l'ensemble de la population et de réduire le nombre de poissons concernés, nous disposons de protocoles d'échantillonnage qui nous permettent de cibler les individus en fonction de l'espèce et de leur classe de taille.

Raffinement : Toutes les précautions sont prises afin de limiter au maximum le stress de ces animaux notamment en veillant à utiliser des bacs de stockage suffisamment grands et en limitant les temps de manipulation.

16740 Notre projet a pour objectif d'évaluer par des tests précliniques, l'efficacité et l'innocuité de nouveaux adjuvants de vaccins destinés aux marchés des animaux de rente. Dans ce cadre, en plus de la tolérance au site d'injection, différents paramètres de la réponse immunitaire seront analysés, nous permettant alors d'identifier les meilleurs candidats adjuvants.

La population mondiale devrait atteindre 9,8 milliards de personnes en 2050. La lutte contre les maladies infectieuses, chez l'homme comme chez l'animal, est l'un des grands enjeux de la santé mondiale. Certaines maladies animales peuvent avoir de forts impacts, pour les animaux eux-mêmes, notamment au sein d'élevages, en menaçant notre alimentation, mais aussi par la transmission à l'homme. A ce jour, la vaccination est l'un des moyens les plus efficaces pour faire face aux maladies infectieuses. Que ce soit dans le domaine de la santé vétérinaire ou humaine, les laboratoires pharmaceutiques développent des molécules de plus en plus complexes et purifiées afin de mettre sur

le marché des vaccins ayant une très forte spécificité et présentant une innocuité acceptable. En vaccinologie, cette purification entraîne en général une diminution de l'efficacité des vaccins, qu'il est nécessaire de compenser par la présence d'adjuvants d'immunité puissants et bien tolérés. Les adjuvants de vaccins sont des substances augmentant l'intensité de la réponse immunitaire après co-administration avec la molécule d'intérêt. Ils sont utiles pour permettre aux vaccins d'induire des réponses immunitaires puissantes et persistantes, mais aussi pour réduire la dose vaccinale, le nombre d'injections et augmenter la stabilité du vaccin. Si l'intérêt des adjuvants a été démontré depuis plusieurs décennies, une plus grande efficacité et une meilleure tolérance sont sans cesse recherchées. En complément des vaccins traditionnels dits injectables, un intérêt majeur est porté sur le développement de nouveaux produits destinés à l'administration par voie muqueuse (voie intranasale notamment). Les voies alternatives à l'injection sont en effet de plus en plus utilisées dans le monde vétérinaire car adaptées à la vaccination de masse des animaux de rente.

La souris est le meilleur modèle animal afin d'effectuer cette première étape de criblage de nouveaux adjuvants avant confirmation sur l'animal cible (volaille, porc, bovin). Le système immunitaire est une structure relativement complexe qui fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires et humoraux que seule l'expérimentation *in vivo* permettra de mettre en oeuvre.

Le schéma vaccinal repose sur deux administrations (primo et rappel) que le vaccin soit administré par voie sous cutanée ou par voie intranasale. L'innocuité sera appréciée par l'observation des réactions locales (dépôts de vaccin, granulomes, nécroses) aux sites d'injection 7 jours après chaque administration. Si jamais celles-ci devenaient trop importantes, les animaux concernés seront directement mis à mort. L'efficacité sera évaluée par un suivi sérologique des anticorps spécifiques à différentes dates de prélèvements. Par ailleurs, certains organes pourront être prélevés après mis à mort, en vue d'une caractérisation plus fine de l'immunité (identification des cellules et des molécules impliquées dans la réponse immunitaire). L'analyse de ces paramètres, sera systématiquement confrontée à 2 lots témoins : un lot vaccin sans adjuvant et un lot caacin avec adjuvant de référence. L'adjuvant de référence est un adjuvant que nous utilisons depuis longtemps et dont on connaît le profil d'innocuité et d'efficacité. Il présente 2 intérêts majeurs : (1) il est très bien toléré et n'engendre pas de réaction locale importante permettant ainsi de définir le niveau de sensibilité des souris face à l'injection ; (2) il génère chez la souris, une bonne réponse immunitaire. Au même titre que l'innocuité, il nous permet ainsi d'identifier les écarts sur des lots de souris mais surtout de positionner les nouvelles formules testées au regard des performances de cet adjuvant de référence.

Ce projet est prévu sur 5 ans nécessitera un maximum de 2500 souris, soit 500/an.

Dans le cadre de ce projet, la règle des 3 R sera appliquée. Au titre du Remplacement, l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales est nécessaire. Il n'existe pas d'alternative suffisamment prédictive, dans la mesure où le système immunitaire est complexe et fait intervenir de nombreux organes et acteurs cellulaires et/ou humoraux. Les modèles *in vitro* existants ne permettent pas d'apporter une vision globale de la réponse immunitaire induite. Concernant la Réduction, le nombre d'animaux sera réduit au maximum mais devra être suffisant afin d'avoir une bonne représentabilité permettant d'exploiter les données générées. Les groupes seront constitués ainsi de 5 souris. Au sujet du Raffinement, les vaccinations seront indolores et réalisées avec des aiguilles stériles très fines. Le site d'injection sera systématiquement désinfecté à l'alcool avant la piqûre. Le prélèvement sanguin au sinus rétro orbitaire est la méthode la moins invasive permettant la collecte de volume de sang suffisant. Les prises de sang seront suffisamment bien espacées dans le temps afin de ne pas trop manipuler les animaux. Dans le cas où des réactions locales excessives et inacceptables apparaîtraient après vaccination, les animaux seraient immédiatement mis à mort.

A terme, les différents essais expérimentaux chez la souris permettront de sélectionner des candidats adjuvants intéressants qui seront ensuite testés à partir d'un vaccin d'intérêt, chez l'animal cible dans des conditions d'élevage. Les données collectées contribueront à développer et à mettre sur le marché de nouveaux adjuvants dédiés aux vaccins vétérinaires et adaptés aux différentes applications.

16741 Contexte scientifique: Le sens de l'équilibre est une fonction vitale pour la survie car il permet de manière réflexe, automatique, le maintien et la stabilisation d'une posture cohérente. Les organes de l'équilibre, appelés organes vestibulaires, sont localisés au niveau de l'oreille interne. Ils nous

permettent de nous orienter dans l'espace et de distinguer nos mouvements propres et ceux de notre environnement, et ainsi de nous déplacer en toute sécurité. Lors de séjours dans l'espace, l'absence de gravité perturbe ces organes, ce qui est à l'origine de désorientations, d'illusions d'inversion et d'une forme de mal des transports : le mal de l'espace. Le sens de l'équilibre est capable de s'adapter à ces nouvelles conditions en quelques jours. De retour sur terre, le sens de l'équilibre revient à la normale après un temps d'adaptation plus ou moins long selon la durée du séjour dans l'espace.

Le but de nos expériences est de comprendre comment le sens de l'équilibre s'adapte lorsque les mammifères sont exposés à des changements de gravité. Il est très difficile de mener à bien ces expériences dans l'espace pour des questions de coût et d'accessibilité. Sur terre, il est impossible de supprimer la gravité. Afin d'étudier cette question nous utilisons le PGA (plateau à gravité augmentée) du Centre Nationale des Etudes Spatiales (CNES). Les protocoles expérimentaux consistent donc à étudier comment les animaux s'adaptent à des transitions répétées entre des niveaux de gravité de 1G et 5G.

Objectifs de l'étude: nous explorons l'hypothèse d'un lien entre des processus inflammatoires et les capacités d'adaptation du système nerveux central des souris. Chez certains animaux, la présence d'immunoglobuline au niveau du cerveau suggère que l'hypergravité pourrait conduire à des processus inflammatoires que nous voulons corrélés à la qualité de l'adaptation/ réadaptation. Nous souhaitons en particulier tester des accélérations courtes mais de forte intensité mimant celles subies par l'organisme au cours de la mise en orbite. Une rupture temporaire de la barrière hémato-encéphalique au cours de ces phases pourrait avoir des implications importantes pour les spationautes. Ces recherches nous permettent de mieux comprendre les mécanismes liant la plasticité adaptative au système immunitaire et notamment au rôle de la barrière hémato-encéphalique et de l'inflammation. Il s'agit de questions importantes pour la physiologie spatiale ayant des implications également pour les situations de fortes accélérations rencontrées sur terre.

La présente demande concerne un total de 70 souris. Les animaux sont répartis en 4 groupes, 1 groupe contrôles et 3 groupes centrifugés à des intensités et durées croissantes. Nous évaluerons ensuite l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et les changements immuno-histochimiques intervenant au niveau cérébral.

La mise en place de ce protocole respecte les objectifs des 3R

Réduction: Afin de Réduire le nombre de souris, les résultats seront évalués statistiquement une fois les 2/3 de l'étude réalisés afin de voir si les résultats obtenus permettent de ne pas réaliser le dernier 1/3.

Remplacement: Les expériences proposées visent à identifier les mécanismes cellulaires à l'origine des capacités d'adaptation du cerveau à des perturbations de l'environnement telles que celles observées par exemple lors de séjours spatiaux au cours des phases de décollage et de rentrée dans l'atmosphère. La corrélation comportement / processus cellulaires ne peut être effectuée que sur modèle animal et il n'est à ce stade des expériences pas possible de Remplacer ce 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. La douleur 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 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".

16742 Un implant dentaire est une racine artificielle qui est placée dans l'os alvéolaire pour remplacer une ou plusieurs dents manquantes et sur laquelle repose une prothèse dentaire fixe, tel qu'une couronne en céramique. La principale condition pour l'implant dentaire est d'avoir un os en bon état et c'est pour cela que certaines techniques sont appliquées pour pallier le manque d'os, tels que la greffe d'os qui est très employée. Souvent, la greffe d'os doit être accompagné de la pose des membranes barrières afin de bloquer l'entrée de cellules provenant de l'épithélium et du tissu conjonctif environnants qui empêchent la bonne intégration de l'implant. Le développement de membranes barrières implantables pour guider la régénération osseuse représente une des thématiques de notre équipe.

L'objectif de cette étude est de caractériser des membranes préparées à base de matériaux d'origine naturelle et conçues pour protéger le tissu osseux de l'infiltration des cellules épithéliales gingivales pendant le processus de régénération. En particulier, nous voudrions étudier la réponse inflammatoire, la biodégradation et l'infiltration cellulaire par les cellules de l'hôte.

L'intervention sur les souris sera réalisée sous anesthésie générale (analgésique+ antalgique). Quatre incisions seront réalisées sur la peau de part et d'autre de la ligne médiane dorsale, pour introduire des disques de membrane à évaluer. Les animaux auront une injection d'antalgique à la fin de la chirurgie. Les membranes implantées seront évaluées à 1, 2, 4, 8 et 12 semaines.

Cette étude a été conçue dans le respect du bien-être animal en appliquant la règle des 3 R :

Remplacer : pour étudier la dynamique de remodelage et l'implication du système immunitaire, l'évaluation des biomatériaux ne peut s'apprécier que sur modèle animal. Actuellement aucun modèle *ex vivo* ne peut simuler cet événement.

Raffiner : Après l'intervention chirurgicale, les animaux sont surveillés jusqu'à la phase de réveil puis tous les jours par du personnel bien formé. Une injection sous cutanée d'un analgésique sera réalisée pour réduire la douleur.

Une grille d'évaluation de la douleur (points limites sont stricts, adaptés et précoces), tout au long de l'étude, a été mise en place pour identifier des signes de souffrance chez l'animal. Si les signes sont modérés, l'animal recevra une injection sous cutanée d'un analgésique, si les signes persistent ou s'aggravent, l'animal sera euthanasié.

Réduire : le nombre minimum d'animaux à utiliser a été déterminé d'après un test statistique (test de Kruskal-Wallis) prenant en compte la variabilité biologique inter-individuelle. Un nombre de 10 animaux par groupe est nécessaire pour assurer des résultats statistiquement pertinents. Ne seront implantées que les membranes qui répondent, *in vitro*, aux bonnes propriétés mécaniques et biologiques (élasticité, malléabilité, biocompatibilité, dégradation *in vitro*...) ce qui participe aussi à la réduction du nombre d'animaux.

Plusieurs tissus peuvent être partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Cette étude nécessite l'utilisation de 400 souris sur 5 ans: 10 animaux par groupe et par temps de sacrifice x

8 groupes (qui correspondent à 6 formulations + 2 groupes control) x 5 temps de sacrifice. Les souris seront tous des mâles jeunes adultes.

16743 Les anomalies de développement du cerveau sont à l'origine de malformations structurales et fonctionnelles, entraînant incapacité intellectuelle et épilepsie réfractaire aux traitements chez les patients atteints. Une meilleure connaissance des bases physiopathologiques de ces atteintes cérébrales, à travers l'étude d'organismes modèles pertinents, est donc indispensable à l'identification de nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques, et au développement de nouvelles pistes thérapeutiques.

Ce projet est conduit dans le respect du principe éthique des 3R. Il combine des approches anatomiques et fonctionnelles menées chez 3 modèles murins (2 modèles souris, 1 modèle rat) au sein d'une même équipe de recherche (8 membres), permettant une utilisation au plus juste (principe de réduction) des effectifs d'animaux soumis à expérimentation (447 rats et 783 souris pour 5 ans). Une part importante des expérimentations est réalisée *in vitro* (principe de remplacement), sur tranches de tissu cérébral maintenue en survie artificielle lors d'enregistrements électrophysiologiques, ou pour des études anatomiques réalisées après préparation de spécimens histologiques. Les explorations fonctionnelles menées *in vivo* sont limitées aux explorations ne pouvant être effectuées que chez l'animal entier : il s'agit de l'enregistrement de l'activité cérébrale par électro-encéphalographie, pratiquée dans des conditions très semblables aux explorations pré-chirurgicales effectuées chez les patients (principe de raffinement), et sans contrainte (transmetteurs télémétriques "sans fil"). Une partie des animaux explorés fait l'objet d'un monitoring vidéo associé à l'enregistrement de l'activité cérébrale, de l'activité motrice et de la température corporelle, permettant d'assurer une surveillance continue des

indicateurs comportementaux. Certaines méthodes d'exploration fonctionnelle sont peu invasives, et utilisent des méthodes d'imagerie trans-crânielles permettant un suivi longitudinal des animaux explorés.

Les animaux sont hébergés en animalerie A2 (température, luminosité, cycle jour-nuit et hygrométrie contrôlée) avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. L'hébergement respecte les groupes sociaux, à l'exception de certaines explorations fonctionnelles menées en condition isolée. Les animaux font l'objet d'un suivi quotidien par les expérimentateurs et les zootechniciens, et leurs conditions d'hébergement sont enrichies (litière foisonnante, bâtons à ronger, tunnels, dômes, selon l'espèce). La récupération post-opératoire, la souffrance et la douleur sont évaluées (grilles de score) et traitées (anesthésie et analgésie appropriée).

16744 Le syndrome de l'intestin irritable est une pathologie intestinale chronique très répandue (10-15% de la population), altérant la qualité de vie des patients par l'inconfort digestif et les douleurs abdominales générées, et une cause majeure de consultations médicales dans le monde occidental. Bien que d'origine multifactorielle, des facteurs nutritionnels contribuent fortement à l'aggravation des symptômes.

Le fer héminique contenu dans la viande rouge et les charcuteries induit la formation d'alcénals, à savoir des produits issus de l'oxydation de lipides responsables d'une altération de l'écosystème colique, en modifiant à la fois : l'état inflammatoire local, la perméabilité de la barrière intestinale et la composition du microbiote, à savoir des paramètres également impliqués dans le syndrome de l'intestin irritable.

Il a été montré que le 4-hydroxynonanal, un alcénal naturellement produit en réponse à des lésions tissulaires, était capable d'activer des voies neuronales de la sensibilité à la douleur. L'objectif de ce présent projet de recherche est (i) de tester l'hypothèse qu'un régime enrichi en fer héminique pendant 21 jours induit une augmentation de la sensibilité à un stimulus douloureux par le biais d'une expérimentation pilote nécessitant 60 souris mâles C3H/HeN âgées de 8 semaines.

Le projet se poursuivra uniquement si une modulation de la sensibilité à la douleur était observée. Plusieurs expérimentations complémentaires devront alors permettre de démontrer : (ii) l'implication spécifique du fer héminique, (iii) des produits issus de l'oxydation des lipides, et (iv) de leurs voies d'activation conduisant à une sensibilité à la douleur accrue. Pour ce faire, la composition du régime sera modifiée (ajout de calcium pour inhiber la réactivité du fer héminique), des eaux fécales de souris des études précédentes (traitées ou non pour y soustraire les alcénals) seront infusées dans le côlon de souris naïves, et des voies de signalisation spécifiques seront inhibées par l'ajout d'aminoguanidine dans l'eau de boisson. Ces données plus fondamentales seront cruciales pour envisager de nouvelles pistes thérapeutiques qui pourront se poursuivre en partie par des approches *in vitro*.

En fonction des résultats de ces études, un autre axe sera également exploré pour évaluer l'impact du régime enrichi en fer héminique consommé par la souris gestante-allaitante sur la sensibilité à la douleur de sa descendance devenue adulte. En effet cette exposition, strictement sur cette période autour de la naissance dans ce modèle préclinique, induit chez la descendance à long terme une empreinte spécifique caractérisée par (i) la persistance de la production d'alcénals sans apport de fer héminique dans le régime de la descendance, associée à (ii) une altération du microbiote intestinal, de la barrière intestinale et du métabolisme du glucose. Ainsi, connaître l'impact du régime maternel sur la susceptibilité à induire chez sa descendance une sensibilité à un stimulus douloureux accrue et chronique est d'un grand intérêt pour mieux comprendre leur survenue et les prévenir sur la base de recommandations nutritionnelles adaptées à la période périnatale.

Ce projet sur 5 ans, non modélisable par une approche cellulaire *in vitro*, nécessitera l'utilisation de 1284 souris au maximum comprenant à la fois les souris nécessaires à la reproduction et leur descendance et sera réalisé en respectant fidèlement la règle des 3R. Concernant les procédures associées à ce projet, 600 souris seront soumises à une chirurgie accompagnée pour 240 d'entre elle d'une infusion intracolique, le tout sous anesthésie générale (analgésiques/myorelaxants) à raison de 1h à 2h par intervention par souris. En post-opératoire, la douleur (anti-inflammatoires non stéroïdiens) sera également palliée durant les jours qui précèdent la mesure de la sensibilité viscérale tout en

veillant au maintien de la température corporelle et à la déshydratation des souris. Durant la mesure, la perception du stimulus douloureux est alors ressentie 10 secondes à 4 reprises et associée à un inconfort, un stress et une mobilité réduite de la souris. Si les chirurgies en elle mêmes sont associées à un niveau de classification de sévérité modérée, la mesure de la sensibilité viscérale associée engendre un niveau de sévérité sévère. Par ailleurs, 324 souris seront placées chacune 24 heures sur des grilles en cage à métabolisme, occasionnant un stress et un inconfort justifiant d'un degré de sévérité léger. Pour ces souris, un gavage par une solution de glucose ou une injection d'insuline est prévue et associée à la collecte d'une microgoutte de sang au moyen d'un lecteur de glycémie à 7 reprises sur 2h30 de suivi au total. Le stress occasionné par nos interventions multiples justifie un degré de sévérité modéré.

Le nombre d'animaux prévu a été calculé au plus juste, et la réalisation effective de chacune des études sera conditionnée par les résultats de la précédente. Pour l'axe périnatal, le nombre de souris est basé sur une convention établie pour les études développementales afin de permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables et exploitables avec le moins de portées de souris possible. Un personnel compétent fera un suivi quotidien pour leur apporter tous les soins nécessaires et maximiser leur bien-être. Il leur assure en parallèle des manipulations les moins stressantes possibles avec des conditions d'hébergement optimales.

16745 Les infections bactériennes pulmonaires représentent une des causes majeures de mortalité à travers le monde. Le fort taux de mortalité et de morbidité est essentiellement dû à la détérioration des fonctions respiratoires et à la fréquente évolution des pneumonies bactériennes en septicémie. Devant la recrudescence du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, de nouvelles thérapies privilégiant l'activation du système immunitaire innée commencent à voir le jour. Les nouveaux enjeux sont désormais de développer des moyens d'activer spécifiquement les effecteurs nécessaires à l'élimination du pathogène tout en protégeant les tissus infectés. Pour cela, la compréhension des signaux moléculaires et cellulaires activés lors d'une infection est une étape primordiale pour la conception de nouvelles thérapies anti-infectieuses.

L'objectif de ce projet consiste à caractériser les mécanismes (moléculaires et cellulaires) impliqués dans l'activation des cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3) pulmonaires en vue de développer de nouveaux traitements antibactériens ciblant spécifiquement ces cellules.

La complexité du processus infectieux et de la réponse immunitaire associée ne peut être reproduite uniquement dans des tests *in vitro*. Pour ces raisons, nos investigations nécessitent des tests chez l'animal, plus particulièrement chez la souris. Le modèle murin est à ce jour le plus pertinent pour caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse anti-infectieuse respiratoire. En effet, de nombreux modèles de souris invalidées pour des gènes des cascades immunologiques sont disponibles et permettent de caractériser précisément les mécanismes immunitaires anti-infectieux. Enfin, l'immunité innée qui est ciblée dans notre projet est très conservée entre les mammifères. Ainsi les réponses obtenues dans le modèle préclinique murin pourront être extrapolées à l'humain et permettront peut-être d'envisager le transfert rapide de ces approches antibactériennes chez l'homme.

Ce projet suivra les exigences de remplacement, de réduction, et de raffinement. Ainsi, des analyses statistiques seront effectuées en amont des infections expérimentales pour définir le nombre optimal de souris pour obtenir une puissance statistique suffisante. Par ailleurs, des analyses multiparamétriques et à haut débit (analyse de l'expression génique par puces à ADN, PCR haut débit, ou dosages multi-cytokines) permettront d'obtenir le maximum de données exploitables par animal et ainsi de limiter le nombre utilisé. Les expériences seront généralement composées de 4 groupes de souris (contrôle, traitées, infectées, infectées et traitées) et des échantillonnages à différents temps post-traitement seront effectués. Pour les expériences d'efficacité du traitement, 8 souris par groupes seront nécessaires alors que 5 souris par groupe seront utilisées pour les analyses multiparamétriques de l'immunité pour un total de 4560 souris. La validation des facteurs immunologiques responsables de la défense anti-infectieuse sera réalisée sur des animaux génétiquement modifiés.

Alors que les infections vont induire un degré d'altération sévère chez l'animal, les doses, les voies d'administration et les durées de traitements utilisés n'induisent pas de douleur (sévérité légère à modérée sous sédation si nécessaire). Les traitements participent surtout à l'élimination du pathogène

et à l'amélioration significative de l'état général des animaux, et modélisent avant tout les interventions qui pourraient être réalisés chez l'homme.

Enfin, une attention toute particulière sera portée sur l'état global des animaux au cours de l'infection. Un point limite sera défini en fonction des paramètres physiques, physiologiques et cliniques et permettra de limiter au maximum la souffrance des animaux.

16746 Les patients polytraumatisés paralysés présentent de nombreuses complications qui impactent leur récupération et leur qualité de vie. Parmi ces complications, les paraostéoarthropathies neurogènes (POAN) sont un développement anormal de tissu osseux au sein du muscle, à proximité des articulations. Ces ossifications entraînent des douleurs, des limitations fonctionnelles (raideurs articulaires) et des compressions des nerfs et des vaisseaux qui ont des conséquences majeures chez ces patients déjà lourdement handicapés.

Depuis leur description pendant la première guerre mondiale, il n'existe aucun traitement médical efficace pouvant pallier cette complication. La seule option thérapeutique est la résection chirurgicale du tissu osseux. Ce traitement tardif et palliatif expose ces patients fragiles à de nombreux risques anesthésiques et opératoires. L'une des raisons du délai de prise en charge est le fait que cette complication est diagnostiquée tardivement et ne se développe pas chez tous les patients. Parce que son mécanisme d'apparition est inconnu, il est impossible actuellement de proposer des thérapeutiques préventives ou curatives.

Les facteurs de risques reconnus et publiés chez l'humain sont, jusqu'à ce jour, rétrospectifs et confondants. Des études de culture *in vitro* de cellules issues de résidus opératoires de POAN de patients nous ont permis d'identifier des molécules possiblement impliquées dans la genèse des POAN. Néanmoins, cette approche a des limites et elle ne peut pas rendre compte de la complexité de la pathologie dans laquelle des facteurs à la fois locaux et systémiques sont impliqués. Dans ce contexte, l'utilisation d'un modèle murin est indispensable pour étudier les mécanismes précoces et identifier de potentielles cibles thérapeutiques. En effet, la procédure nécessaire pour modéliser les POAN fait appel à de la chirurgie et une stimulation de l'ostéogenèse au niveau du muscle qui n'est réalisable que sur animal vivant.

Nous souhaitons étudier ces mécanismes grâce au modèle souris de POAN mis en place par nos collaborateurs au Mater Institute, University of Queensland (Brisbane, Australie). Il associe une section médullaire chirurgicale en T11-T12 à une lésion musculaire par injection de cardiotoxine (CTX) dans les muscles ischio-jambiers ou tibial antérieur. La formation d'une POAN est alors strictement localisée dans le muscle injecté avec la CTX. Dans nos modèles *in vitro* nous avons identifié des petites molécules (micro-ARN) qui sont susceptibles de contribuer à la genèse de POAN. Cette étude chez l'animal doit nous permettre d'explorer leur rôle dans un environnement beaucoup plus complexe alliant lésion neurologique, inflammation et activations hormonales.

Aucune procédure de remplacement permettant d'éviter le recours à l'expérimentation animale n'est connue à ce jour. Nous tentons au maximum de raffiner toutes nos expérimentations de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux et d'annihiler ou de diminuer le plus possible le stress et la douleur. Les procédures d'anesthésie, de chirurgie et de prise en charge de la douleur ont été établies dans des protocoles. Le suivi post-opératoire associé à une surveillance clinique rapprochée de deux observations par animal et par jour sont strictement réalisés.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les expérimentations précédentes de nos collaborateurs dans le but d'atteindre une puissance statistique suffisante pour l'interprétation des résultats. Afin d'appliquer le principe de réduction, les muscles cibles de la patte arrière controlatérale de chaque souris opérée servira de contrôle négatif à l'injection de cardiotoxine pour une division par deux du nombre d'animaux. Une première étude comprendra 2 groupes expérimentaux, 6 souris/groupe et trois temps d'arrêt (J2, J4 et J7) soit 36 souris. La deuxième étude comprendra également 2 groupes expérimentaux, 8 à 12 souris/groupe et trois temps d'arrêt (J2, J4 et J7) soit 48 à 72 souris. Nous prévoyons ainsi un minimum de 8 souris incluses dans un premier temps. Si les objectifs principaux de l'étude sont atteints, aucun autre animal ne sera inclus, s'ils ne sont pas atteints

4 animaux supplémentaires le seront. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera compris entre 84 à 108 souris.

16747 Les dysfonctions et faiblesses musculaires, causées par des maladies héréditaires, le cancer ou le vieillissement, comptent parmi les problèmes de santé publique les plus dévastateurs. Le principal obstacle au développement de thérapies musculaires est de parvenir à délivrer les molécules thérapeutiques aux muscles. En effet, les muscles squelettiques représentent 40% de la masse corporelle et sont répartis dans tout le corps : un traitement doit être capable de cibler efficacement tous les muscles touchés. Ce projet vise à développer une nouvelle stratégie de délivrance de molécules thérapeutiques aux muscles. La stratégie cible spécifiquement les muscles, mais utilise des cellules sanguines, qui sont naturellement capables de circuler dans tout le corps et de pénétrer dans les muscles enflammés. Cette stratégie novatrice pourrait constituer une solution systémique pour surmonter le problème de la délivrance musculaire.

Il est nécessaire de tester la faisabilité et l'innocuité de cette stratégie dans un modèle préclinique. La souris est utilisée ici comme organisme modèle car son organisation musculaire est très similaire à l'homme et elle offre des avantages techniques essentiels. Le projet est divisé en 4 procédures et utilise 96 souris. Les cellules sanguines humaines exprimant des constructions génétiques thérapeutiques sont injectées puis l'efficacité de délivrance des molécules thérapeutiques à des muscles lésés est évaluée.

Les 3R sont appliqués notamment par les actions suivantes :

- Afin de réduire le nombre d'animaux, l'imagerie de bioluminescence *in vivo* permet d'observer la progression de l'expérience sans avoir à mettre à mort l'animal, pour minimiser le nombre d'animaux nécessaires.

- Afin de réduire la souffrance des animaux, des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés pour toute procédure susceptible de causer du stress ou de la douleur à l'animal. Les souris sont surveillées quotidiennement après les manipulations et des aliments spéciaux sont utilisés afin de faciliter l'accès des animaux à la nourriture pendant leur rétablissement après manipulation. Des signes de maladie, de perte de poids, de souffrance, de lésions ou de détérioration de l'état de santé général constituent des points limites où les souris sont mises à mort.

- Une preuve de principe validant la stratégie est en train d'être obtenue *in vitro*, et les constructions génétiques thérapeutiques sont toutes validées *in vitro*. Le projet vise maintenant à déterminer si une délivrance systémique de cellules sanguines modifiées peut permettre d'atteindre les muscles, ce qui doit nécessairement être réalisé *in vivo*

chez l'animal.

16748 L'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels utilisateurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques stipule dans son article 5 que les personnes appelées à utiliser des animaux à but scientifique doivent bénéficier tout au long de leur exercice professionnel d'un programme de formation continue dans les domaines liés à leur pratique professionnelle représentant l'équivalent de trois jours sur une période de six ans, pour assurer le maintien des compétences.

L'entraînement à la réalisation d'actes techniques (injections, prélèvements, gavages, pose de cathéter) et de chirurgie fait partie des actes de formation continue des personnels, comme la participation à des congrès, à des séminaires. L'entraînement continu des personnels développe une pratique plus sûre des actes sur les animaux, permettant de réaliser ces actes avec le minimum de douleur et de stress pour les animaux.

Le recours à l'utilisation d'animaux se justifie par le manque actuel de modèle mimant de manière satisfaisante l'anatomie des animaux pour la réalisation d'actes techniques.

Une attention sera portée à l'hébergement et aux soins de ces animaux. Au cours de chaque session de formation, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter rapidement les premiers signes anormaux et ainsi prendre les mesures nécessaires pour le bien-être de l'animal. Une pesée hebdomadaire sera réalisée tout au long des sessions de formations. Toute anomalie clinique observée

sera rapportée à un vétérinaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi. Des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc...).

Pour ce projet de cinq ans, 200 souris, 100 rats, 40 lapins, 40 cobayes, 20 cottons rats, 20 furets, 100 oeufs embryonnés de poule et 100 poussins pourront être utilisées, pour un total maximal ne dépassant pas 620 animaux.

16749 Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement de maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

L'objectif de ce projet est d'étudier les fonctions des cellules régulatrices à inhiber la prolifération de cellules effectrices de rats Sprague Dawley déficients en IL34 vs WT dans un modèle *in vivo* de "maladie de perte" de poids: modèle expérimental de maladie auto-immune. Les cellules sont injectées chez des rats déficients pour le récepteur gamma de l'IL2 (IL2Rgamma déficient: Sprague Dawley), en effet ces rats sont immunodéprimés, ainsi ils ont très peu de cellules pouvant réagir contre les cellules injectées évitant leur rejet. L'utilisation de la lignée déficiente pour l'IL34 (KO IL34) a été déjà validée par le comité d'éthique et le ministère. Les rats IL2Rgamma déficients sont aussi déjà présents au laboratoire. Des tests *in vitro* permettent de tester ces fonctions (réalisés en parallèle) mais ils ne miment pas la complexité d'un organisme.

Le nombre maximum d'animaux utilisé sera de: 60

Le bien être animal étant crucial et étant donné la sévérité du modèle, le nombre d'animaux a été réduit au maximum permettant de conclure de manière fiable sur l'étude. De plus, un tableau définissant les points limites a été établi afin qu'aucun animal ne se retrouve dans un état de souffrance important. Dans un but d'améliorer leurs conditions de vie et éviter l'angoisse, des objets d'enrichissement seront placés dans la cage.

16750 Le trouble de spectre de l'autisme (TSA) est une maladie neuro-développementale provoquée par une altération des processus contrôlant le développement du système nerveux. Le TSA touche environ 1 enfant sur 60 et est caractérisés par des symptômes extrêmement handicapants pour la vie quotidienne. Une meilleure compréhension de la base neurobiologique du TSA est cruciale pour la prise en charge des symptômes de TSA et pour l'éventuelle élaboration de nouvelles approches thérapeutiques. À cet égard, les études précliniques utilisant des modèles animaux du TSA représentent une piste importante et complémentaire aux études cliniques, car elles permettent une exploration des mécanismes neuronales sous-jacent les complexes symptômes de TSA.

Les études antérieures (réalisées sur les sujets humains, ainsi que sur les modèles précliniques, tels que la souris transgénique) suggèrent que la manifestation clinique du TSA est, en partie, due à une altération de la connectivité entre les différentes régions du cerveau. L'objectif de notre projet est d'explorer, chez un modèle génétique (la souris transgénique), les altérations présentes dans une zone spécifique de cerveau. Cette zone est impliquée dans la manifestation clinique du TSA. Pour mener nos études, nous utiliserons des tests comportementaux ainsi que les analyses neuro-anatomiques. Certains de nos études visent à comprendre les conséquences d'une modification de l'activité des neurones présents dans cette zone cérébrale et impliqueront l'expression d'un récepteur modifié.

En cohérence avec la directive européenne, et le principe des 3Rs nous avons réfléchi notre programme expérimental de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, ainsi que la souffrance imposée par les procédures détaillées dans ce document. Raffinement : Les animaux sont hébergés de manière adaptée à leurs besoins (hébergement en cage collective, mise à disposition du matériel pour la construction d'un nid) et reçoivent une surveillance quotidienne et les soins adaptés (anesthésie, analgésie, stratégie pour éviter la déshydratation ou l'hypothermie et une surveillance des signes cliniques). Remplacement : notre projet porte sur l'étude de la connectivité neuronale, en cohérence avec les études menées chez l'homme, et nécessite donc l'utilisation des systèmes

complexes et entiers. Pour ces raisons, le remplacement avec les animaux de plus faible sensibilité, ou par les méthodes *in vitro* ou *in silico* n'est pas possible à ce jour. Réduction : nous avons réfléchi aux expériences de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire à l'exploitation statistique des résultats. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire pour la réalisation de ce projet crucial à 338 animaux. Le bénéfice attendu de notre projet est une meilleure compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents à l'autisme et à terme, la possibilité de proposer de nouveaux traitements pharmacologiques ciblant ces altérations.

16751 Notre laboratoire développe des polymères chirurgicaux biocompatibles pour différentes applications cliniques. L'une des principales propriétés de nos polymères est d'adhérer à différents tissus biologiques et d'être efficaces sur une longue période (plusieurs semaines à plusieurs mois).

Un premier produit a déjà été évalué en clinique pour son utilisation en tant qu'adjuvant aux sutures, dans le cadre de chirurgies de reconstruction vasculaire. Actuellement, nous développons de nouveaux polymères adhésifs, pour lesquels les applications en clinique sont doubles :

- 1) La délivrance prolongée de molécule après application du conjugué polymère-molécule en local
- 2) Le remplacement de clous ou sutures dans le cadre de chirurgies telles que les hernies ventrales et inguinales

Notre projet a donc pour buts d'évaluer la capacité de ces nouveaux polymères à adhérer de manière efficace aux tissus biologiques pour permettre :

- 1) La délivrance sur le long terme de molécules thérapeutiques
- 2) La fixation de plaque pour la réparation tissulaire dans la chirurgie des hernies ventrales et inguinales

Après une caractérisation chimique de ces polymères, une évaluation de leurs propriétés mécaniques et adhésives *ex vivo* et des études *in vitro* (pour déterminer la cinétique de relargage de molécules thérapeutiques notamment), nous souhaiterions valider les résultats précédemment générés par des études *in vivo* dans un modèle ovin, le mouton.

L'objectif de ce projet est donc multiple :

- 1) Confirmer la capacité de nos produits à adhérer à différents types de tissus biologiques (muqueuses, tissus de la région du péritoine, fascia, muscle) pour des périodes courtes à prolongées (variant de quelques jours à plusieurs semaines ou mois)
- 2) Valider la tolérance aux produits et médicaments testés sur les tissus d'intérêt
- 3) Comparer nos produits à des produits déjà commercialisés

Afin de générer les résultats souhaités, le mouton a été choisi comme modèle expérimental pour sa pertinence et, notamment, ses similitudes morphologiques avec l'Homme concernant la cavité nasale. Plusieurs groupes de moutons seront utilisés pour les différentes procédures chirurgicales que nous souhaitons mener. Ces procédures expérimentales sont couramment utilisées en clinique et, par conséquent, connues et publiées dans des revues spécialisées.

Sur 5 ans, nous utiliserons un total de 18 animaux. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain :

- a) Remplacement : quand cela sera possible, nous effectuerons des études *ex vivo*, utilisant des organes d'animaux sacrifiés et des abats de boucherie.
- b) Réduction : le nombre d'animaux à utiliser a été rationalisé au maximum en tenant compte des analyses statistiques qui seront effectuées. De plus, chaque animal sera utilisé pour évaluer la capacité des polymères à adhérer de manière efficace à la fois à la muqueuse nasale ainsi qu'aux tissus biologiques dans la région du péritoine.
- c) Raffinement : une pré-sélection des produits à tester sera effectuée avant les études. De plus, les procédures chirurgicales décrites prennent en compte le temps de récupération des animaux et un nombre d'essais visant à réduire leur stress, fatigue et souffrance.

16752 De nombreuses situations pathologiques (situations cataboliques) mènent à une perte de muscle importante. Cette perte de muscle se caractérise par une perte de masse, un changement de structure

et des modifications métaboliques, le tout ayant pour conséquences une perte d'autonomie, des retards de récupération, et à terme des coûts de prise en charge élevés. Notre objectif répond à un enjeu majeur de santé publique : Développer des stratégies d'intervention pour préserver la masse musculaire et améliorer la récupération musculaire. Nous avons précédemment montré que l'utilisation d'un régime alimentaire enrichi en un acide gras oméga 3, le DHA (Acide Docosahexaénoïque), permettait de préserver la masse musculaire lors d'une atrophie musculaire induite. Depuis nous avons également montré que la voie de signalisation eIF2a/ATF4 était activée après 2 mois de supplémentation en DHA.

L'objectif de ce projet est de déterminer le rôle de cette voie dans les effets bénéfiques du DHA sur le maintien de la masse musculaire en utilisant i) un modèle qui reproduit une situation catabolique avec une perte de masse musculaire associée, i.e. le jeûne, et ii) des approches d'inactivation pharmacologique et génétique de cette voie de signalisation.

La composition corporelle et l'activité spontanée des souris seront évaluées pendant le protocole expérimental. Nous évaluerons les paramètres qui contrôlent la masse et la fonction musculaire, i.e. le métabolisme protéique musculaire, les réserves énergétiques intramusculaires, et les paramètres de l'homéostasie mitochondriale...

Nous estimons que 720 souris au maximum seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 5 ans. 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 : Nous étudions les effets de différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaire. L'expérimentation animale est nécessaire car elle permet de considérer la globalité de l'organisme et les interactions entre les différents organes et tissus. En effet, des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier peuvent influencer la cinétique de perte musculaire. Nous avons choisi la souris comme modèle animal car il permet de mettre en place des modèles d'étude pertinents pour la physiologie musculaire et car des modèles transgéniques disponibles. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

- Réduire : Nous avons prévu le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux différentes questions scientifiques, garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et palier l'exclusion de certaines souris dans l'expérimentation. Ce nombre d'animaux maximal sera revu à la baisse quand les résultats obtenus ne nécessiteront pas de répétitions pour valider les observations.

- Raffiner : Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. i) Les animaux seront adaptés à leur environnement avant l'expérimentation. ii) Un suivi (poids corporel, prise alimentaire) des animaux, hebdomadaire (pendant la période de mise sous régime alimentaire enrichi en DHA) et bi-quotidien (pendant le jeûne et les traitements administrés), sera réalisé. iii) Des points limites ont été définis pour identifier rapidement tout signe de souffrance éventuel ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial). Dans ce cas, l'animal sera retiré des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent. Par ailleurs, les animaux auront un enrichissement dans la cage sous la forme d'une boule pour améliorer les conditions d'hébergement.

16753 Les maladies inflammatoires aujourd'hui regroupées sous le terme d'IMID (immune mediated inflammatory disease) ont une incidence en constante augmentation notamment dans les pays industrialisés. Elles peuvent être systémiques comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et les vascularites ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, ou encore le psoriasis. Parmi ces maladies inflammatoires, certaines sont auto-inflammatoires et d'autres auto-immunes, elles ne mettent pas en jeu les mêmes cellules du système immunitaire mais dans tous les cas, cela conduit à une réponse inflammatoire exacerbée. Cette inflammation entraîne la formation de lésions, une réparation tissulaire inefficace voire la destruction de l'organe dans les formes les plus sévères.

Les traitements actuels essaient de limiter cette inflammation à l'aide de différentes molécules notamment chimiques donc non-spécifiques. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire,

qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. De tels traitements ont fait l'objet d'essais cliniques dans différentes pathologies de l'inflammation comme les molécules inhibitrices du TNF-alpha (une des principales cytokines sécrétées par le système immunitaire innée et responsable de l'inflammation). Seulement, l'effet de ces molécules n'est pas spécifique à la pathologie mais à l'ensemble des réponses immunitaires et elles sont associées à de nombreux effets secondaires.

Les nouvelles stratégies d'immunothérapie cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires et pour cela les approches sont plus spécifiques de populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires spécifiques de l'organe pathologique. Parmi les populations du système immunitaire, il existe des populations suppressives de la réponse inflammatoire. Augmenter leur fonction suppressive pourrait conduire à limiter l'inflammation engendrée par les populations effectrices. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire.

Nous aimerions tester différentes molécules capables d'activer un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité *in vivo* dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris. Le nombre d'animaux utilisés sera de 1314 souris (réparties dans 5 modèles différents, selon 4 axes par modèles, et 5 groupes par axe) 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.

16754 La maladie d'Alzheimer touche environ 900 000 personnes en France et plus de 40 millions de personnes dans le monde. Après 80 ans, le nombre de personnes atteintes augmente rapidement pour atteindre 15% de la population. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement efficace pour prévenir ou guérir la maladie. Ainsi, on estime que le nombre de patients atteints de la maladie d'Alzheimer devrait doubler d'ici à 2050 suite à l'augmentation de l'espérance de vie de la population mondiale. La maladie d'Alzheimer est invalidante et mortelle entraînant une dégénérescence progressive des neurones du système nerveux central (SNC) notamment des zones impliquées dans des processus cognitifs comme la mémoire, dont l'hippocampe. Les signes histopathologiques de la maladie d'Alzheimer sont 1) les plaques amyloïdes extracellulaires composées principalement du peptide bêta amyloïde ; 2) les neurodégénérescences fibrillaires composées essentiellement de formes hyperphosphorylées de la protéine tau.

De plus, il y a une comorbidité digestive souvent associée à la maladie d'Alzheimer qui se traduit par des défauts de transit gastro-intestinal et des atteintes de la perméabilité de la barrière épithéliale. Ces observations suggèrent que la maladie d'Alzheimer toucherait aussi bien le SNC que le système nerveux entérique (SNE). En effet, certaines altérations dans le SNE, pourraient constituer les premiers signes précurseurs avant que le cerveau ne soit touché dans certaines maladies comme la maladie d'Alzheimer. Cependant, on ne sait pas grand chose des mécanismes moléculaires qui causent ces altérations au niveau intestinal et des événements conduisant aux déficits cognitifs. C'est pour cela qu'il est important de comprendre comment le SNE fonctionne et comment ses cellules sont régulées en condition normale ou pathologique. De ce fait, nous avons besoin de générer un modèle animal reproduisant les atteintes digestives observées chez l'homme. En effet, les modèles actuels de souris Alzheimer possèdent le plus souvent un transgène permettant essentiellement une production du peptide amyloïde restreint au cerveau qui ne récapitule pas les atteintes périphériques, notamment les altérations au niveau du SNE.

Le but du projet est de générer des lésions intestinales caractéristiques de la maladie d'Alzheimer en injectant *in situ* des peptides amyloïdes par laparotomie chez des souris de phénotype sauvage. Cela permettra d'une part de 1) déterminer si ces formes toxiques de peptides amyloïdes causent des altérations intestinales ; 2) déterminer les mécanismes impliqués ; 3) déterminer si ces lésions induites

au niveau de l'intestin induisent des déficits cognitifs, notamment des pertes de mémoires spatiale ou contextuelle.

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, la réalisation du modèle d'injection de peptides sera effectuée sous anesthésie générale. Les animaux du modèle recevront de l'analgésique avant l'opération, puis 1 fois par jour pendant 3 jours, pour éviter toute souffrance. Les souris seront conservées dans des cages de taille suffisante, et avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Le bien-être des souris sera surveillé tout au long de l'étude tous les jours, avec mise en place d'un enrichissement par frisos, 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 reproduites 2 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera 265 animaux (souris C57Bl6) maximum dont 10 souris maximum de « réforme » que nous utiliserons afin d'optimiser nos gestes et nos expérimentations.

16755 Notre société est une CRO (Clinical Research Organization– organisme de recherche sous contrat) qui mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique. La présente saisine est donc une saisine générique (vu avec la DSV, le CEEA et le MESR pour la soumission de saisines génériques) qui a pour but d'évaluer différents dispositifs médicaux utilisés pour le comblement d'une perte de substance osseuse dans des pathologies diverses. Plusieurs spécialités sont concernées par le recours aux biomatériaux dans cette indication (chirurgie orthopédique, neurochirurgie, chirurgie dentaire, chirurgie maxillo-faciale, chirurgie ORL et cervicale, chirurgie tumorale, etc.).

L'objectif du projet est d'évaluer la biocompatibilité et l'efficacité de biomatériaux implantés *in vivo* chez le rat. La biocompatibilité des biomatériaux sera évaluée selon la norme ISO 10993-6 "Evaluation biologique de dispositifs médicaux - essais concernant les effets locaux après implantation"

3 procédures font l'objet de la demande d'autorisation. La première procédure concerne l'évaluation de la biocompatibilité de biomatériaux implantés en sous-cutané chez le rat âgé d'au moins 6 semaines au moment de la chirurgie. Les biomatériaux sont implantés en sous-cutané au niveau, de la ligne médiane dorsale, des épaules, au-dessus du sacrum ou dans les flancs de l'animal. Deux sites d'implantation supplémentaires peuvent être acceptés : au niveau des 2 pattes postérieures. La deuxième procédure concerne l'évaluation de la biocompatibilité et/ou du potentiel ostéoinducteur de biomatériaux implantés en intra-musculaire chez le rat âgé d'au moins 6 semaines au moment de la chirurgie. Les biomatériaux sont implantés de chaque côté de la colonne vertébrale dans les muscles glutéaux et/ou au niveau des pattes postérieures entre le biceps femoris et le glutéus. La troisième procédure concerne l'évaluation de la biocompatibilité et/ou du potentiel ostéoformateur de biomatériaux implantés dans des défauts osseux condyliens induits chez le rat âgé d'au moins 10 semaines au moment de la chirurgie. Les biomatériaux sont implantés dans des défauts osseux de 3 mm de diamètre générés au niveau des condyles fémoraux. Pour chacune des procédures, 2 à 3 points de cinétique peuvent être évalués avec le sacrifice d'animaux à chacun des points de cinétique afin d'évaluer le comportement des biomatériaux au cours du temps. Des prélèvements de fluide biologique peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang et/ou les urines et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse NFS par exemple. De même, des analyses radiographiques pour localiser les biomatériaux et évaluer la reconstruction osseuse ou la formation d'os ectopique peuvent être réalisées au cours du protocole. Afin d'évaluer la vitesse de néoformation osseuse autour des biomatériaux, les animaux recevront une double injection de Calcéine fluorescente par voie intrapéritonéale avant leur euthanasie (4 et 14 jours avant sacrifice). La durée des procédures varie de 2 semaines à 6 mois selon la cinétique de reconstruction osseuse et la durée de dégradation des matériaux le cas échéant. A la fin de la procédure, une analyse macroscopique du site d'implantation sera réalisée et ces derniers seront prélevés pour une analyse en imagerie et histologie.

Quelle que soit la procédure, 10 sites d'implantation par condition/par point de cinétique sera évalué selon les recommandations de la norme ISO 10993-6.

Au maximum 10 conditions seront testées :

- condition 1 = création de logettes sous-cutanées ou musculaires ou de défauts osseux sans implantation
- conditions 2 à 9 = implantation des matériaux d'essai
- condition 10 = implantation d'un matériau standard

Etant donné que 2 sites d'implantation par rat sont possibles et que 3 points de cinétique maximum sont évalués, un total maximum de 150 rats est requis par procédure. Sur la base de la réalisation de 3 procédures par an sur 5 ans, 2250 animaux seront nécessaires. Les implantations, les prélèvements sanguins et les suivis radiographiques seront réalisés sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane).

Les implantations entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard et le lendemain si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Les biomatériaux seront testés *in vitro* au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme.

Réduire : pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisé est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Toutefois, les biomatériaux seront préalablement testés *in vitro* afin de réduire le nombre de candidats à tester *in vivo* en excluant les candidats les moins prometteurs.

Raffiner : le raffinement passe par la réduction de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu. Les actes chirurgicaux et les traitements analgésiques seront réalisés par des expérimentateurs formés ce qui permet de réduire le traumatisme et le stress induit. Outre la gestion de l'analgésie, l'état général et clinique des animaux sera surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier et par un porteur du projet pour estimer une éventuelle gêne ou douleur. Cette évaluation journalière sera plus spécifiquement axée sur les douleurs occasionnées par les suites de l'acte chirurgical, les effets secondaires des traitements s'ils sont connus et sur le poids de l'animal (indice majeur de stress et de souffrance). L'évaluation journalière permettra la mise en place et l'ajustement de traitements analgésiques. Tout animal ayant atteint un ou plusieurs des points limites (repéré le plus précocement possible grâce à un suivi quotidien) sera euthanasié.

16756 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) demeurent un véritable fléau aussi bien à l'échelon individuel qu'en termes de santé publique. Ils constituent la deuxième cause de décès, la première cause de handicap acquis chez l'adulte et la deuxième cause de démence. Les AVC sont parmi les affections les plus coûteuses qui existent, consommant 2 à 4% du coût total des dépenses de santé dans le monde. Cette situation est préoccupante puisque toutes les prévisions vont dans le sens d'une augmentation du nombre d'AVC dans les années à venir.

Les modèles murins ont apporté des connaissances fondamentales sur la physiopathologie de l'AVC. Plusieurs molécules ont pu être testées et montrer leur bénéfice en terme de protection cérébrale chez l'animal. Malheureusement, aucune molécule n'a pu apporter la preuve de son efficacité chez l'humain. Ces discordances entre les rongeurs et les humains proviennent en partie de l'absence d'évaluation fonctionnelle dans les modèles précliniques.

Parmi les AVC, l'hémorragie intracérébrale (HIC) représente 15% des AVC. Il n'existe malheureusement pas de traitement spécifique des HIC. Plusieurs modèles murins modélisant l'HIC ont été développés ces dernières années afin de caractériser les mécanismes de la pathologie et de

nouveaux traitements. Quelques rares études se sont intéressées à la récupération fonctionnelle consécutive à une HIC. Toutefois, ces tests, en majorité manuels, sont fastidieux à gérer, montrent une grande variabilité, mesurent souvent un spectre étroit des caractéristiques de la marche et posent des problèmes en termes de sensibilité, de quantification et d'objectivité.

Ce projet consiste donc à caractériser, dans un modèle d'HIC induite par une injection cérébrale de collagénase bactérienne chez le rat, des indicateurs fiables et objectifs du statut neurologique (score clinique) et de la motricité globale spontanée (actimétrie) et fine (CatWalk®) sur la période chronique post-AVC.

Ce projet ne permet pas de contourner l'utilisation d'un modèle d'HIC chez le rat, anesthésié pour la chirurgie, et vigile pour les tests comportementaux. Notre 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-après. Le rat est l'espèce la plus utilisée dans les études de l'HIC et de la récupération fonctionnelle. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que la chirurgie et les tests comportementaux chez les sujets. Une collaboration avec deux statisticiens nous a permis de procéder au plan expérimental de ce projet afin de nous assurer de l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux. Le nombre d'animaux utilisés dans cette étude est de 30. Plusieurs études publiées utilisant ce modèle d'HIC montrent que les animaux retrouvent leurs facultés à manger et à se déplacer seuls 24 heures après la chirurgie. En post-opératoire, l'état de chaque rat sera contrôlé quotidiennement afin de s'assurer de son bien-être. La douleur post-chirurgie sera traitée par l'administration d'analgésiques. Néanmoins, si un animal montrait des signes cliniques de souffrance (ex. perte de poids > 10% du poids initial...), celui-ci serait immédiatement retiré du protocole et euthanasié selon les procédures décrites dans le paragraphe 4.2.

Mots clefs : Hémorragie intracérébrale, récupération fonctionnelle, actimétrie, catwalk

16757 D'après l'OMS, les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. On comptait effectivement en 2012, 8.2 millions de décès liés à la maladie. Le carcinome hépatocellulaire ou hépatocarcinome est un cancer du foie, le cinquième cancer le plus répandu dans le monde. Il est le plus fréquent chez les adultes et la cause de décès est la plus fréquente chez les personnes atteintes de cirrhose, survenue le plus souvent en raison d'une hépatite virale chronique, d'un abus d'alcool, d'une maladie auto-immune ou de trouble métabolique héréditaire. La prise en charge de ces patients atteints d'une maladie hépatique est compliquée. En effet, à ce jour, il existe plusieurs types de traitements contre ce type de cancer reposant le plus souvent sur la chimiothérapie, l'immunothérapie ou la radiothérapie. Ces traitements ont montré une diminution des tumeurs et une amélioration de la survie mais ne permettent pas une rémission de ce cancer dans 100% des cas. Le taux de survie reste très variable selon le stade du cancer au moment du diagnostic. Il est donc important de développer de nouvelle génération de traitement anti-cancéreux.

Ce projet a donc deux objectifs :

- Caractériser la croissance tumorale des lignées cellulaires tumorales,
- Evaluer l'efficacité anti-tumorale de différents traitements innovants.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable un cancer car ces derniers peuvent toucher de nombreuses cellules et organes différents et présentent de nombreuses interactions cellulaires et humorales.

L'efficacité de ces nouveaux traitements anti-tumoraux sera testée sur un modèle murin pouvant être immunodéprimé à la fois pour permettre une pousse tumorale et également pour empêcher toute réaction de rejet du traitement administré. Les cellules cancéreuses pourront être suivies par imagerie de bioluminescence ou par tomographie à rayon X (scanner) au cours du temps. Ces méthodes d'imagerie apportent plusieurs avantages. Elles sont non invasives et requièrent seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen. D'un point de vue éthique, elles permettent de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car les animaux pourront être conservés tout au long de l'étude (R de Réduire). Cela permettra également de visualiser le développement des cellules cancéreuses dans l'organisme (impossible à visualiser à l'œil nu) et donc de déterminer des points limites plus prédictifs

(R de Raffiner). Lors de ce projet, 5 études de caractérisation de la lignée tumorale et 20 études d'évaluation de l'efficacité de différents traitements anti-tumoraux seront réalisées. L'utilisation au préalable de souris d'un nombre maximum de 50 pourront servir à développer la tumeur en sous-cutanée afin de l'implanter dans le foie sur les animaux de l'étude. Au final, un total de 1325 souris maximum sera utilisé.

Les souches de souris utilisées pouvant être immunodéprimées, une attention toute particulière sera portée à l'hébergement et aux soins de ces animaux afin d'éviter toute infection. Au cours de chaque étude, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter rapidement les premiers signes anormaux et ainsi prendre les mesures nécessaires pour le bien-être de l'animal. Une pesée 3 fois par semaine au minimum (mais pouvant être plus fréquente en fonction de l'état clinique des animaux) sera également réalisée tout au long de l'étude après injection des cellules tumorales. Toute anomalie clinique observée sera rapportée à un vétérinaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi. Des points limites seront définis tout au long des études et des méthodes thérapeutiques pour prévenir l'apparition de ces points limites seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférence avec les produits testés (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc.).

16758 La maladie d'Alzheimer (MA) est la plus fréquente des démences. Certains neurones sont largement impliqués dans les processus affectés au cours de la MA et sont la cible privilégiée des traitements actuels.

L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux traceurs radiopharmaceutiques marqués au fluor-18 pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de la MA par imagerie moléculaire TEP (Tomographie par Emission de Positons). Le développement d'une méthode de quantification doit d'abord être réalisée chez l'animal et nécessite d'évaluer la cinétique des traceurs radioactifs dans un compartiment de fixation non spécifique (qui ne contient pas de cible à laquelle se fixe le traceur). Ce compartiment par excellence est le sang, il est donc nécessaire d'évaluer la cinétique des traceurs radioactifs dans le compartiment sanguin ce qui nécessite de réaliser des prélèvements veineux.

Les objectifs spécifiques sont d'évaluer ces nouveaux traceurs chez l'animal pour envisager de les transposer en clinique humaine. Nous utiliserons 20 traceurs sur 5 ans.

Un total de 400 rats mâles adultes sur une période de 5 ans sont nécessaire à la réalisation de cette étude préclinique.

Ce protocole répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacement : Cette étude de caractérisation in-vivo des traceurs radiopharmaceutiques sur des rongeurs ne peut être substituée par une méthode alternative in-vitro ou sur cellules, puisque l'objectif final est d'utiliser ces traceurs pour des explorations *in vivo* en clinique. En effet les mécanismes de fixation et de dégradation (métabolisme) des traceurs ne peuvent être étudiés que dans un organisme vivant entier.

Réduction : Grâce à une planification rigoureuse des expériences, le nombre d'animaux utilisés est réduit afin d'obtenir des résultats interprétables.

Raffinement : De plus, le développement et l'utilisation des techniques d'exploration fonctionnelle in-vivo telle que le Micro-TEP permettent de considérablement diminuer la pénibilité des expériences subies par l'animal de laboratoire dans l'objectif de réduire la souffrance et le stress de l'animal. La perte en volume sanguin engendrée par les prélèvements sanguins est entièrement maîtrisée par le manipulateur. Les animaux ont un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau dans leur cage d'hébergement. Les animaux seront hébergés 2 par cage en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel, papier absorbant et bâton à ronger. Toutes les stratégies d'analgésie et d'anesthésie et de soin seront mises en oeuvre pour réduire au maximum tout inconfort qui pourrait être induit.

16759 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 complètement satisfaisants. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles molécules plus performantes représente un intérêt majeur pour la filière équine. Précédemment, deux nouvelles molécules ont été identifiées comme possiblement intéressantes pour la filière : le beta Nerve Growth Factor (NGF) et le C6 (analogue de la kisspeptine)

Dans ce cadre nous souhaitons effectuer deux expériences demandant chacune 8 ponettes. Ce projet utilisera donc un total de 16 individus.

La première vise à évaluer la capacité du NGF à stimuler la sécrétion des hormones de la reproduction. Nous utiliserons huit (8) ponettes Welsh qui recevront au cours de nos deux jours d'expérimentation une administration de sérum physiologique puis une administration de 1 mg de NGF.

Pour la seconde expérience: après l'obtention de résultats indiquant que le C6 permet la stimulation des hormones de la reproduction nous voulons maintenant évaluer si une injection intramusculaire pourrait avoir des effets comparables à ceux obtenus avec l'injection intraveineuse. En effet, dans une optique de développement d'un traitement facilement administrable et prenant en compte le bien-être animal, il nous apparaît préférable de pratiquer une injection dans un muscle plutôt que dans une veine. Nous utiliserons huit (8) ponettes Welsh qui seront réparties en deux lots de 4 animaux qui recevront sur une première semaine d'expérience une injection de sérum physiologique puis de C6 par voie intramusculaire ou intraveineuse et sur une deuxième semaine d'expérience une injection de sérum physiologique puis de C6 par la voie d'administration non précédemment pratiquée.

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

Remplacer: Nous cherchons à tester si nos protocoles provoquent une augmentation de la sécrétion des hormones essentielles à l'ovulation chez la jument. L'observation de cette réponse physiologique ne peut pas être faite *in vitro* mais seulement *in vivo*. De précédentes pré-études ou une analyse bibliographique ont été effectuées pour déterminer les doses de molécules à injecter à nos animaux.

Réduire : De précédentes pré-études ou une analyse bibliographique ont été effectuées pour déterminer les doses de molécules à injecter à nos animaux. Nos précédents protocoles réalisés sur l'espèce équine ont montré que des groupes de 8 animaux permettaient d'effectuer des analyses statistiques valables. De plus, nous réutiliserons des animaux ayant participé à d'autres procédures.

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. »

16760 Le développement et la validation de nouveaux modèles précliniques pour les études en radiobiologie nécessitent une caractérisation dosimétrique (c'est-à-dire une évaluation de la dose de rayonnement reçue) et une évaluation des lésions radio-induites.

Le projet présenté ici a pour objectif de mettre en place, valider et caractériser un nouveau modèle d'irradiation permettant de mimer les conditions d'exposition de la radiologie interventionnelle (c'est-à-dire les actes médicaux réalisés par des radiologues et sous contrôle radiologique, permettant le traitement ou le diagnostic de nombreuses pathologies). Le développement de ce modèle nous permettra de mieux comprendre les conséquences et les complications de ce type d'exposition notamment dans le cas de surexposition médicale ou accidentelle. L'objectif de ce projet est double : d'une part de caractériser le modèle d'un point de vue dosimétrique et d'autre part d'évaluer et de quantifier les lésions radio-induites.

La dosimétrie est un aspect essentiel pour le développement et le bon déroulement des projets de recherche utilisant des rayonnements ionisants. L'objectif de cette première partie sera d'effectuer une caractérisation dosimétrique du modèle d'irradiation permettant de mimer les brûlures radiologiques au niveau du membre inférieur gauche de la souris. 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 rayonnements X de basse énergie, comme ce qui est utilisé en radiologie interventionnelle. 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

effectuant des prélèvements différents temps post-irradiation. Ces mesures nous permettront de mettre en évidence l'impact du remodelage osseux.

La seconde partie de ce projet sera consacrée à l'évaluation et à la quantification des lésions radio-induites pouvant survenir suite à ce type d'exposition. Pour cela, une caractérisation physique grâce à l'acquisition et l'analyse d'images micro scanner sera réalisée afin d'évaluer les dommages induits au niveau osseux et vasculaire. Ces résultats seront ensuite à corrélés aux mesures biologiques que nous souhaitons réaliser avec notamment l'analyse de coupes histologiques pour ces mêmes paramètres.

L'ensemble de ces résultats nous permettront de mieux connaître les spécificités radiopathologiques de ces types de brûlure à basse énergie, identifier les causes de ces spécificités ainsi que de contribuer à l'amélioration de la prise en charge des patients et améliorer la prédiction du risque.

Pour ce projet, nous projetons d'utiliser un maximum de 1920 souris sur 5 ans. L'utilisation des animaux est nécessaire pour ce projet afin d'avoir une estimation précise de la dose absorbée par l'os et de caractériser les lésions radio-induites au niveau d'un organisme entier ; cette évaluation ne pourrait être possible que via des méthodes *in vivo*. A plus long terme, la validation de ce modèle permettra d'étudier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le pronostic, le diagnostic et les prises en charge de ce type de complications. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées 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, mise en place de points limites adaptés).

16761 Chaque année en France, 2500 enfants sont diagnostiqués d'un cancer. Une partie d'entre eux gardera des séquelles des traitements agressifs actuels (radiothérapie, chimiothérapie...), et 1 enfant sur 5 ne pourra pas être soigné. Il est donc nécessaire de trouver des thérapies innovantes et efficaces pour pouvoir soigner plus et mieux les enfants atteints de cancers. Notre projet s'inscrit dans cette perspective et porte sur deux cancers pédiatriques : les DIPG (Gliomes infiltrants du tronc cérébral) et les RMS (rhabdomyosarcomes).

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. Parmi eux, 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. Le taux de survie des enfants et adolescents atteints de RMS est de 70%, et chute à 20% si des métastases sont présentes.

Les gliomes sont quant à eux des tumeurs qui se développent à partir des cellules gliales, les cellules de soutien du cerveau. Ils représentent 2% des cancers chez l'adulte mais 20% des cancers chez l'enfant. Une forme particulièrement agressive de gliome chez les enfants est le gliome infiltrant du tronc cérébral (DIPG). Il touche entre 30 et 40 enfants chaque année en France. Aucun traitement n'est actuellement disponible : l'élimination chirurgicale de la tumeur est impossible du fait de sa localisation (plusieurs fonctions vitales passent par le tronc cérébral, dont la régulation de la respiration et du rythme cardiaque) ; des séances de radiothérapie permettent une régression temporaire de la tumeur seulement chez certains patients qui rechutent quelques mois après ; et aucune chimiothérapie ou thérapie ciblée n'est efficace.

Il est donc nécessaire d'identifier les anomalies moléculaires associées à la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer la prise en charge de ces cancers.

Dans ce cadre, ce projet de recherche vise à tester l'efficacité anti-tumorale d'une approche de thérapie génique à l'aide de vecteurs viraux en utilisant un modèle de greffe de cellules de RMS et de DIPG chez la souris. Ce modèle ne peut pas être remplacé par un modèle *in vitro*, car seule l'étude *in vivo* chez la souris permet de démontrer la spécificité des vecteurs viraux pour les tumeurs tout en préservant le tissu sain environnant ; ainsi que d'attester de leur efficacité anti-tumorale. Ce modèle d'étude préclinique chez la souris permet de mimer au plus près la pathologie humaine et d'évaluer ces nouvelles approches thérapeutiques. Ce modèle pourrait ainsi constituer une thérapie prometteuse

pour le traitement de DIPG et de RMS et permettrait de pallier les effets secondaires connus de la radiothérapie et de la chimiothérapie de par sa haute sélectivité.

Dans ce projet, 138 souris seront utilisées. 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 éventuelle d'anesthésiant et d'analgésique, un suivi des animaux trois fois par semaine par deux expérimentateurs formés, et la définition précise des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, seront mis en œuvre 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.

16762 La dénutrition protéino-énergétique est fréquente en France puisqu'on estime à deux millions le nombre de personnes touchées. La dénutrition peut être soit la conséquence d'une diminution de la prise alimentaire associée ou non à des dérèglements métaboliques dans le cadre d'une pathologie aiguë ou chronique soit liée au vieillissement. La dénutrition est associée à une augmentation des complications infectieuses liées à une immunodépression, un retard de cicatrisation, une diminution de la fonction musculaire et une perte d'autonomie, voire une augmentation de la mortalité.

Le rôle de l'axe intestin-cerveau dans la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme a été mis en évidence avec un effet sur le contrôle de la prise alimentaire mais également sur la régulation des dépenses énergétiques ainsi que sur le métabolisme protéique musculaire. Des données récentes ont montré qu'une souche bactérienne dérivée de *Lactobacillus plantarum* WJL (Lp) améliorait la croissance au cours des premiers jours ou semaines de vie dans différents modèles (drosophile, souris). Cette souche est capable d'interagir avec les cellules intestinales en stimulant leur synthèse de peptidases et ainsi potentialiser la métabolisation et l'absorption d'acides aminés, les rendant disponibles pour stimuler la synthèse protéique au niveau périphérique. L'étude de ces données en font un candidat très prometteur pour prévenir ou traiter la dénutrition protéino-énergétique chez le sujet âgé ou souffrant d'une maladie chronique tel que le cancer.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les capacités de Lp à stimuler la prise de poids et la masse maigre chez le rat. Une hypothèse secondaire est que Lp serait capable de stimuler la prise alimentaire.

Pour réaliser ce projet, une dénutrition sera induite chez des rats mâles Wistar âgés par une alimentation pauvre en protéines (5% contre 17% dans l'alimentation standard). Une deuxième approche visant à l'utilisation d'un modèle associant dénutrition et anorexie induit par un agent de chimiothérapie (le méthotrexate ou MTX), sera réalisée chez des rats mâles Sprague-Dawley de 200-250 g. Une injection par jour sur trois jours de 2,5 mg/kg de MTX en sous cutanée sera effectuée, les rats étant sous une alimentation standard. Les effets d'une supplémentation en Lp réalisée de manière préventive ou curative seront évalués. Lp et la solution contrôle seront apportés par un gavage quotidien. Le poids et la composition corporelle, la prise alimentaire, le métabolisme protéique ainsi que des voies de régulation seront étudiés. Ces approches conduiront à l'utilisation de 112 rats pour le modèle âgé et 120 pour le modèle MTX dont 80 avec MTX soit 232 au total. Ce nombre prend en compte un calcul de puissance statistique basé sur la variabilité connue des mesures réalisées et l'objectif de gain de poids.

Les mécanismes aboutissant à une dénutrition étant multiples et complexes, ainsi que les voies métaboliques mobilisées au cours de la renutrition, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. Au regard de la règle des 3R, pour limiter le nombre d'animaux, certaines approches très mécanistiques sont menées sur des modèles cellulaires (co-culture bactérie – cellules intestinales) comme par exemple l'étude de l'absorption des acides aminés. 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 rats resteront une semaine en période d'acclimatation avant le début de l'expérimentation ; (ii) les rats seront disposés dans une cage ordinaire au lieu d'une cage métabolique afin de permettre des interactions avec leurs congénères pour les rats âgés ; (iii) les rats placés en cage ordinaire seront disposés à 2 par cage ; (iv) le milieu de la cage sera également enrichi de coton pour leur permettre de réaliser des nids. Pour prendre en charge la douleur qui pourrait survenir au cours de la dénutrition, une évaluation de la souffrance sera réalisée deux fois par jour à l'aide d'une échelle validée. En cas

de douleur avérée, les animaux recevront une injection de buprénorphine à la dose de 0.05 mg/kg. Si la douleur persiste plus de deux jours, les animaux seront mis à mort. Si la douleur est très élevée, les animaux seront mis à mort. De plus, en cas de perte de poids supérieure ou égale à 15% sur 3 jours consécutifs ou en cas de non-réponse à la manipulation quotidienne (pesée et observation), les animaux seront mis à mort. Lors des procédures expérimentales, une prise en charge de la douleur pourra également être mise en place par une injection de buprénorphine à la dose de 0.05 mg/kg si besoin.

Les résultats attendus sont une stimulation de la prise de poids et en particulier de la masse musculaire dans les groupes supplémentés en Lp apportant ainsi des éléments à des études chez l'homme.

16763 Les neurosciences cognitives ont un énorme potentiel pour étudier et déduire la vie mentale des animaux. Chez l'homme, l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) est couramment utilisée pour déduire les processus perceptifs, les mécanismes cognitifs, les émotions, les états mentaux et, finalement, la conscience. Avec l'inclusion de concepts tels que « état mental positif », « attentes » et « perception » dans des définitions récentes du bien-être animal, il est évident que les neurosciences cognitives peuvent nous aider à comprendre les besoins de bien-être des animaux. Même lorsque l'on n'examine pas le bien-être en soi, la neuroimagerie cognitive peut nous renseigner sur les capacités et les préférences perceptuelles et cognitives des animaux - facteurs déterminants du bien-être d'une espèce ou même d'un individu. Ces connaissances contribueraient également au débat sur le statut juridique des animaux, dans lequel les capacités cognitives sont une considération importante. Malgré son potentiel, la neuroimagerie cognitive chez les animaux de ferme n'en est qu'au stade de la conception.

Les objectifs généraux de ce projet sont:

- 1) Fournir des connaissances fonctionnelles et structurelles fondamentales sur le système sensoriel auditif du cerveau du mouton et en particulier sur son réseau de traitement de l'information sociale.
- 2) Initier l'utilisation de l'IRM fonctionnelle pour étudier les capacités perceptives et cognitives d'animaux de ferme.

Nous utiliserons ici l'IRMf pour 1) localiser, pour la première fois, l'étendue 3D du cortex auditif du mouton et définir son organisation fonctionnelle et 2) étudier si les moutons ont une partie de leur architecture cérébrale dédiée au traitement des vocalisations spécifiques à l'espèce. Nous émettons l'hypothèse que le cerveau du mouton contient des régions adjacentes au cortex auditif central qui sont significativement plus sensibles aux vocalisations spécifiques à l'espèce qu'aux autres sons. Pour tester notre hypothèse, 24 individus (12 mâles et 12 femelles) de l'espèce Ovins, race Ile de France âgés de 1 à 3 ans, issus des pratiques d'élevage conventionnel, participeront aux expériences IRMf.

Pour notre procédure expérimentale, nous nous efforçons de répondre à la règle des 3R:

Remplacement : Ce projet vise à étudier les capacités de perception auditive des moutons et à développer les techniques de neurosciences cognitives capables d'étudier cet aspect et d'autres de la vie mentale des animaux de ferme. La recherche sur la vie mentale des animaux nécessite l'inclusion de l'animal dans l'expérience. Cette étude ne peut être conduite sur un autre modèle. Elle ne peut être menée que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement comme une étude *in vitro* n'est envisageable.

Réduction : Le total de 24 individus prévus dans ce projet est le meilleur compromis entre la capacité à tester de manière fiable notre hypothèse et la minimisation du nombre d'animaux de recherche utilisés. Le choix d'utiliser l'IRMf réduit également le nombre d'animaux requis car chaque animal peut participer à plusieurs séances expérimentales (maximum 4) et sera maintenu en vie après cette étude.

Raffinement : L'IRM est la méthode la moins invasive et la plus adaptée pour étudier l'organisation anatomique et fonctionnelle des connexions cérébrales. L'utilisation de l'IRM est un raffinement par rapport aux techniques alternatives de neurosciences plus invasives qui nécessitent l'euthanasie de l'animal. A la suite de cette étude, les animaux seront gardés en vie et seront remis dans leur troupeau. Toutes les mesures seront prises pour promouvoir le bien-être des animaux. En particulier, en tant qu'animaux grégaires, les moutons sont stressés lorsqu'ils sont isolés de leurs congénères. Par

conséquent, les individus seront à tout moment en compagnie d'au moins deux autres membres de leur groupe social - sauf lorsqu'ils sont sous anesthésie pendant l'IRM.

16764 L'hypoparathyroïdie, maladie grave résultant d'une insuffisance de l'hormone parathyroïdienne (PTH) pour maintenir des niveaux normaux de calcium circulant, affecte plus de 80 000 patients aux États-Unis. Elle est associée à un large éventail de symptômes, notamment une irritabilité neuromusculaire légère à débilitante, ainsi que des manifestations neurocognitives et neuropsychiatriques, dus à de faibles taux de calcium dans le sang.

L'objectif de ce projet est de tester un analogue de la PTH, développé spécifiquement pour la thérapie de remplacement de la PTH dans l'hypoparathyroïdie. Cette molécule interagit avec une configuration spécifique du récepteur de la PTH qui entraîne une activation et un effet prolongés sur le métabolisme du calcium. Des études précliniques ont démontré que cette molécule était plus efficace et d'une durée d'action plus longue que la PTH naturelle pour augmenter et maintenir les niveaux de calcium circulants sans augmenter l'excrétion urinaire de calcium.

Il est prévu que le mécanisme d'action unique de cette molécule se traduira par un profil d'innocuité et d'efficacité amélioré et en fera une thérapie de premier ordre pour le traitement de ce trouble endocrinien rare mais grave.

Le but de ce projet est donc d'évaluer l'effet pharmacologique de cette molécule après une administration sous-cutanée unique chez quatre macaques cynomolgus femelles après une thyro-parathyroïdectomie complète.

Afin d'anticiper tout risque potentiellement lié à une thyro-parathyroïdectomie complète, un seul animal sera opéré et subira l'ensemble du protocole qui durera 7 jours post chirurgie. Si l'état de cet animal est satisfaisant à l'issue de l'étude, trois autres animaux subiront le même protocole, ce qui portera le nombre total d'animaux utilisés à 4.

Après une période d'acclimatation et de wash-out suffisante (au moins un mois), les animaux subiront une thyro-parathyroïdectomie complète sous analgésie et anesthésie générale (à J-3). La molécule sera administrée par une injection sous-cutanée à J0, soit trois jours post-chirurgie.

Des prélèvements sanguins seront réalisés à différents timepoints : quelques jours avant la chirurgie puis deux fois par jour (matin et soir) pendant une semaine post-chirurgie afin de suivre notamment les niveaux de calcium dans le sang. Certains timepoints permettront également de doser le calcium ionisé, la PTH, le phosphore et d'autres paramètres biochimiques classiques (ALB, ALB/GLOB, ALKP, ALT, BUN, BUN/CREA, GLOB, GLU, TP). L'animal sera euthanasié à J4.

Réduction : Ce projet prévoit l'utilisation de 4 macaques cynomolgus issus d'un élevage agréé.

Remplacement : La preuve d'efficacité *in vivo* chez l'animal est indispensable à la poursuite du développement de nouvelles thérapeutiques.

Afin de valider l'efficacité d'un nouveau traitement de l'hypocalcémie liée à une hypothyroïdie et avant de le tester chez l'Homme, il est nécessaire de l'évaluer avec un modèle animal pertinent. Dans ce contexte, il est donc judicieux d'utiliser un modèle animal qui mime les mécanismes biologiques observables chez l'Homme dans le cadre d'une hypothyroïdie.

De plus, il s'avère que le macaque cynomolgus est l'espèce Primate la plus couramment utilisée en recherche biomédicale.

Raffinement : Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le personnel est entièrement formé à la réalisation des actes spécifiques sur le modèle PNH. L'intervention chirurgicale sera effectuée par un chirurgien vétérinaire expérimenté. Le vétérinaire est garant du bien-être des animaux qui seront sous sa responsabilité.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse et de le prendre en charge. Des mesures préventives et correctives de diminution de la douleur et du stress seront également définies, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de l'étude si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Ce projet présentant un risque d'hypocalcémie sévère pour les animaux, en plus du suivi rapproché des niveaux sanguins calciques, une attention particulière supplémentaire sera apportée à chaque animal, avec une observation spécifique de son état de conscience, de sa coordination motrice et de son équilibre, de la motricité de ses membres, ainsi que de son comportement oculomoteur.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux, et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal, notamment la mise à disposition et le renouvellement hebdomadaire de jouets dans les hébergements (kong, ballon, tube PVC...), ainsi que la distribution de friandises.

De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

16765 D'après l'OMS, le diabète de type II concernait plus de 422 millions d'individus dans le monde en 2014 et ce nombre continue d'augmenter. En 2015, 1,6 million de décès sont directement attribués au diabète de type II et 2,2 millions supplémentaires à l'hyperglycémie (taux de sucre trop important dans le sang). Les personnes souffrant de diabète de type II font face à une diminution de leur qualité de vie et elles présentent des risques augmentés de survenue d'accidents cardiovasculaires. Des mesures hygiéno-diététiques comme une prise en charge nutritionnelle adaptée couplée à une activité physique sont des mesures efficaces de prévention de ces maladies. Le recours à des médicaments comme la metformine sont des mesures complémentaires à ces mesures hygiéno-diététiques lorsque la maladie a atteint un stade plus avancé. L'utilisation d'extraits végétaux en complément des mesures hygiéno-diététique est également une piste sérieuse pour la lutte contre l'obésité et le diabète de type II et plus généralement le syndrome métabolique. Certains extraits végétaux issus de la pharmacopée européenne ont déjà montré des effets bénéfiques et protecteurs sur le microbiote intestinal et pourraient permettre d'améliorer la qualité de vie et de diminuer les facteurs de risques de développer un diabète de type II. L'objectif de ce projet est d'étudier les bénéfices apportés par différentes formulations innovantes d'extraits végétaux sur la prévention et le développement du diabète de type II dans différents modèles murins et de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces extraits végétaux. Chez les rongeurs (rats, souris, hamsters), il est possible d'induire un état de prédiabète en nourrissant les animaux avec un régime riche en graisse et en sucres (mimant les mauvaises habitudes alimentaires impliquées en partie dans le développement du diabète de type II chez l'homme) durant plusieurs semaines. Un diabète de type II plus sévère peut être obtenu en ayant recours à des animaux présentant un déficit en récepteur à la leptine (hormone impliquée dans la prise alimentaire) comme la souris db/db. Ce projet global de type nutritionnel nécessitera l'utilisation maximale de 1500 souris, 600 rats et 600 hamsters sur une durée de 5 ans. Ce nombre est choisi de manière à obtenir les réponses attendues en ayant recours à des effectifs les plus petits possible. Pour cela le projet se base sur la littérature scientifique existante, utilise des outils de calcul statistique (a priori et a posteriori) et privilégie les méthodes non terminales permettant les suivis longitudinaux des animaux. Les modèles *ex vivo*, *in vitro* et *in silico*, bien que très utiles sur certains aspects, et indispensables au principe de remplacement, ne permettent pas encore d'obtenir une approche globale aussi complexe que celle du diabète et de l'obésité chez un mammifère, pour approcher au plus près de la réalité retrouvée chez l'Homme. Pour ce projet, l'utilisation de modèles murins de petite taille est privilégiée aux plus grandes espèces plus susceptibles de ressentir de la douleur sur une plus longue période. Au cours de ce projet, les animaux seront placés dans un environnement adapté à leurs besoins physiologiques et observés quotidiennement sur la base de critères comportementaux (posture, appétit, interaction avec l'environnement...) et morphologiques (croissance, prise de poids, état général des dents, du poil...) pour prévenir au plus vite de la diminution de leur état de bien-être. Les différents tissus obtenus au cours de ce projet seront stockés pour permettre des analyses ultérieures et éviter de devoir recourir à un projet similaire dans le temps. L'ensemble de ces dispositions favorisent le principe de réduction, raffinement et remplacement de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

16766 Les nanomatériaux (composés de particules < 100nm) sont de plus en plus présents dans le secteur de l'agroalimentaire, 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, entretenue tout au long de la vie via une alimentation contenant ces additifs. Le microbiote joue un rôle majeur dans la protection de l'intestin face aux antigènes alimentaires et un déséquilibre peut favoriser le développement de maladies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), l'obésité et le cancer colorectal (CCR). Le but de ce projet est d'étudier le lien entre l'exposition orale chronique à trois additifs (TiO₂, SiO₂, ZnO) et l'apparition et/ou l'aggravation de désordres métaboliques et de CCR en évaluant l'impact de ces additifs sur la composition et l'activité métabolique du microbiote et ses conséquences sur la barrière intestinale, la réponse immune, l'homéostasie métabolique et l'initiation des lésions pré-néoplasiques coliques.

Pour ce projet des souris germ-free (souris receveuses) seront colonisées avec du microbiote de souris exposées de la vie in utero jusqu'à l'âge adulte à des doses d'additifs (souris donneuses), ou de leur nanomatériau de référence (100% de NPs), encadrant l'exposition humaine. Les additifs seront incorporés dans un régime normal ou un régime riche en lipide puis donnés aux souris donneuses durant 90 jours après sevrage. Les souris receveuses seront exposées à une matrice alimentaire normale (ND) ou riche en lipide (HFD) pendant 100 jours. La composition et l'activité métabolique du microbiote, ainsi que la barrière intestinale, la réponse immune, l'homéostasie métabolique et l'initiation des lésions prénéoplasiques coliques seront étudiés sur les souris receveuses.

Ce projet sera conduit dans le respect de la règle des 3R et nécessitera 2160 souris sur une durée de cinq ans, les modèles alternatifs ne permettant pas de recréer la complexité des dialogues microbiote-hôte. Le nombre de souris a été réduit au minimum requis, par les tests statistiques, pour pouvoir exploiter les résultats. Ensuite, le bien-être animal sera pris en compte par la mise en place d'un enrichissement des cages, par ajout de petites maisonnettes, ainsi qu'un hébergement en groupe des animaux. Mais aussi par l'utilisation de crème anesthésiante à usage local. Enfin, des points limites seront définis et une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée. Toutefois, si malgré toutes les mesures prises pour réduire le stress au minimum, une souffrance est constatée, la procédure sera systématiquement arrêtée.

16767 Le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique majeur avec plus de 300 millions de porteurs chroniques dans le monde. Les traitements actuels ciblent efficacement l'enzyme polymérase du virus, permettant de contrôler sa réplication tant que le traitement est présent. Cependant ils ne permettent pas à ce jour d'inhiber la production des protéines virales qui exercent toujours leurs effets délétères, ni d'éradiquer le virus chez les patients infectés. Il y a donc nécessité de tester de nouveaux traitements ciblant une autre étape de l'infection et ce malgré l'existence d'un vaccin.

L'hépatite delta est la forme la moins fréquente des hépatites virales chroniques mais une des plus sévères. Le pathogène responsable est le virus de l'hépatite D (VHD), un virus défectif qui nécessite la présence simultanée d'une infection par le virus de l'hépatite B (HBV) pour sa propagation. On observe depuis plusieurs années une recrudescence des hépatites liées au VHD.

Une infection par le VHD est donc observée uniquement chez les individus qui sont simultanément infectés par le HBV (globalement 5 à 10% des porteurs du HBV sont co-infectés par le HDV) mais il a également été récemment démontré que le virus HDV pouvait se propager en présence d'autres virus d'hépatite.

Les options thérapeutiques pour l'hépatite D chronique restent malheureusement limitées et des aspects importants de la virologie moléculaire, de la pathogenèse et de l'histoire naturelle de ce virus sont encore inconnus.

Les études dans les modèles *in vitro* d'infection par les virus d'hépatite sont limitées et ne permettent pas de valider les molécules antivirales candidates en termes de métabolisme et pharmacologie dans un contexte plus élaboré faisant intervenir des paramètres indispensables tels que la structure de l'organe foie, le métabolisme et le système immunitaire entre autres.

Alors que des souris « normales » sont résistantes à ces virus humains, les souris humanisées du foie peuvent être infectées par ces virus des hépatites humaines. Ce modèle de souris chimérique, humanisé pour le foie, est donc un excellent support pour 1) caractériser de manière exhaustive les infections par ces virus humains, VHB, VHC (Virus de l'hépatite C), VHD, de différents sous types viraux (présentant des prédominances géographiques différentes ou entraînant des physiopathologies plus ou moins sévères) mais aussi 2) évaluer l'activité antivirale d'agents thérapeutiques.

En termes de retombées scientifiques, ce projet, mené au sein d'une plateforme de souris humanisées, permettra de répondre à un besoin urgent des académiques et partenaires industriels dans la recherche fondamentale et translationnelle sur les maladies infectieuses ciblant le foie.

Les souris sont immunodéficientes (dépourvues de système immunitaire), ce qui permet la xénogreffe de cellules humaines et sont déficientes en une enzyme hépatique. Cette déficience hépatique permet de créer une pression de sélection nécessaire pour la prise de greffe par les cellules humaines (le foie est un organe régénératif, uniquement s'il subit une pression de régénération). Les souris humanisées seront infectées (ou co-infectées) par les différents virus hépatotropes étudiés. Certains groupes expérimentaux seront également traités par différentes molécules thérapeutiques.

La mise à disposition au sein d'une plateforme de souris humanisées d'un tel modèle permet de mutualiser les recherches en offrant aux différents laboratoires un modèle *in vivo* de pointe, ce qui permet de surcroît d'éviter les redondances, de mutualiser les expertises afin d'optimiser chaque expérience.

Le nombre de souris utilisées dans les protocoles a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en minimisant leur nombre. De plus, un grand nombre d'échantillons est prélevé sur chaque animal, afin de générer une banque d'échantillons pouvant ainsi éviter de nouvelles cohortes pour la mise au point de nouvelle technique ou des analyses *ex-vivo* ultérieures, permettant également ainsi de réduire le nombre d'animaux.

Tout au long des expériences, nous veillerons au bien-être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'angoisse des souris grâce à :1) une définition précise des points limites, 2) l'administration de médicaments pour supprimer la douleur si nécessaire (comme par exemple une analgésie adaptée pour la chirurgie), et 3) le choix des méthodes d'injections les moins invasives pour les traitements.

L'historique des expériences précédentes (résultats et connaissances des modèles) permet également d'ajuster et d'optimiser continuellement les protocoles.

Ce projet couvrira les besoins expérimentaux d'au moins 5 équipes travaillant actuellement sur la validation de molécules thérapeutiques sur des projets de recherche fondamentale quant à la compréhension des infections virales. Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 5554 souris.

16768 L'objectif de ce projet est de mettre au point un nouveau dispositif capable d'administrer dans l'abdomen de la souris une chimiothérapie sous forme d'aérosol.

Contexte: La PIPAC: Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy, a été mise en oeuvre chez l'homme à partir de 2013. Elle consiste en l'administration de chimiothérapie sous forme d'aérosol, dans l'abdomen du patient par coelioscopie. Cette technique est donc minimalement invasive. La vaporisation doit améliorer la distribution des agents de chimiothérapie dans la cavité abdominale, et l'application sous pression doit 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 à visée curative de la carcinome 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 notre projet précédent dont la demande d'autorisation de projet a été acceptée par le Ministère, la chimiothérapie était délivrée dans l'abdomen via un dispositif de nébulisation endotrachéale qui n'est pas réutilisable à l'infini (problème d'obstruction) et qui n'est plus commercialisé. Notre volonté est donc de mettre au point un autre dispositif basé sur un générateur d'aérosol ultrasonique.

Aucun dommage n'est attendu du fait que l'ensemble des actes seront réalisés sous anesthésie générale et que les souris seront mises à mort avant réveil. Des souris immunodéprimées (Swiss Nude) à phénotype dommageable seront utilisées pour ce projet mais ce phénotype n'est pas exprimé du fait de leur hébergement en portoir ventilé.

Remplacer: toutes les premières étapes de la mise au point du dispositif seront réalisées dans un "fantôme" en envoyant l'aérosol dans des flacons qui feront office d'abdomen de souris. Les rendements de l'appareil seront déterminés grâce à des filtres capables de piéger l'aérosol généré afin de le quantifier.

Réduire: une fois l'appareil qualifié, un nombre limité de souris seront utilisées (30 au maximum) afin de le tester en condition réel.

Raffiner: Les souris utilisées seront des souris saines, elles seront placées sous analgésie et anesthésiées durant toute la durée de l'expérimentation. Le contrôle du dépôt d'aérosol se fera sous anesthésie par imagerie SPECT non invasive.

16769 La cornée est le tissu le plus greffé dans le monde. Les pathologies endothéliales sont toujours associées à une baisse importante de la densité cellulaire endothéliale (DCE) liées au manque de capacité proliférative des cellules endothéliales cornéennes (CECs) *in vivo*. Une baisse importante de la DCE engendre une perte de transparence cornéenne qui ne peut être rétablie que par la réalisation d'une greffe de cornée. A cause de l'inefficacité des processus de réparation tissulaire, l'endothélium cornéen a longtemps été considéré comme un tissu non régénératif. Nous avons récemment publié une étude qui a soulevé une polémique sur l'existence de la régénération de l'endothélium cornéen chez l'adulte. Nos premières observations suggèrent que des cellules souches/progénitrices situées à l'extrême périphérie de l'endothélium cornéen pourraient être à l'origine d'une régénération très lente de CECs *in vivo* chez l'adulte compensant ainsi la diminution de la DCE (surtout à la périphérie de l'endothélium). Ces travaux ont besoin d'être poursuivis afin d'obtenir plus de résultats.

Le 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) est un nouvel analogue de la thymidine (un des 4 éléments principaux de l'ADN) qui entre en compétition avec cette dernière lors de son incorporation à l'ADN au sein de cellules en division. Il remplace ainsi la Bromodeoxyuridine (BrdU) avec l'avantage d'une révélation plus facile techniquement. L'injection d'EdU chez le lapin suivie d'une fenêtre de 40 jours ou plus sans injection peut être utilisée pour présélectionner des cellules souches *in situ* grâce à son cycle cellulaire très long. Notre première approche sera d'injecter de l'EdU chez de jeunes lapins dans le but d'identifier et localiser pour la première fois les cellules souches/progénitrices spécifiques à l'endothélium.

Le lapin est difficilement remplaçable dans ce projet qui doit se faire obligatoirement en *in vivo*, il est donc impossible éthiquement de mettre en place un tel projet chez l'homme mais aussi c'est le seul animal à avoir les deux critères suivants : proche morphologiquement de l'homme et forte capacité de régénération endothéliale, qui sont deux critères théoriques obligatoires pour que l'expérience soit un succès.

Au total, 10 lapins sont potentiellement prévus pour ce projet. Ce nombre est réduit au MINIMUM pour effectuer des analyses statistiques suffisamment puissantes. Ce nombre doit OBLIGATOIREMENT ÊTRE MIS EN OEUVRE *IN VIVO* afin de permettre aux cellules de proliférer naturellement. Tout est mis en oeuvre 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.

16770 La dénutrition protéino-énergétique est fréquente en France puisqu'on estime à deux millions le nombre de personnes touchées. La dénutrition peut être soit la conséquence d'une diminution de la prise alimentaire associée ou non à des dérèglements métaboliques dans le cadre d'une pathologie aiguë ou chronique soit liée au vieillissement. La dénutrition est associée à une augmentation des complications infectieuses liées à une immunodépression, un retard de cicatrisation, une diminution de la fonction musculaire et une perte d'autonomie, voire une augmentation de la mortalité.

Le rôle de l'axe intestin-cerveau dans la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme a été mis en évidence avec un effet sur le contrôle de la prise alimentaire mais également sur la régulation des dépenses énergétiques ainsi que sur le métabolisme protéique musculaire. Des données récentes ont montré qu'une souche bactérienne dérivée de *Lactobacillus plantarum* WJL (Lp) améliorerait la croissance au cours des premiers jours ou semaines de vie dans différents modèles (drosophile, souris). Cette souche est capable d'interagir avec les cellules intestinales en stimulant leur synthèse de peptidases et ainsi potentialiser la métabolisation et l'absorption d'acides aminés, les rendant disponibles pour stimuler la synthèse protéique au niveau périphérique. L'étude de ces données en font un candidat très prometteur pour prévenir ou traiter la dénutrition protéino-énergétique chez la souris adulte jeune et âgée.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les capacités de Lp à stimuler la prise de poids et la masse maigre chez des modèles murins. Une hypothèse secondaire est que Lp serait capable de stimuler la prise alimentaire.

Pour réaliser ce projet, une dénutrition sera induite chez des souris C57Bl/6 adultes jeunes et âgées par une alimentation pauvre en protéines (5% contre 17% dans l'alimentation standard). Les effets d'une supplémentation en Lp réalisée de manière préventive ou curative seront évalués. Le poids et la composition corporelle, la prise alimentaire, le métabolisme protéique ainsi que des voies de régulation seront étudiés. Ces différentes approches conduiront à l'utilisation de 224 souris. Les mécanismes aboutissant à une dénutrition étant multiples et complexes, ainsi que les voies métaboliques mobilisées au cours de la renutrition, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire. Au regard de la règle des 3R, pour limiter le nombre d'animaux, certaines approches très mécanistiques sont menées sur des modèles cellulaires (co-culture bactérie – cellules intestinales) comme par exemple l'absorption des acides aminés. 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) les souris seront disposées dans une cage ordinaire au lieu d'une cage métabolique afin de permettre des interactions avec leurs congénères; (iii) les souris seront disposées à 4 par cage; (iv) le milieu de la cage sera également enrichi de coton pour leur permettre de réaliser des nids. Pour prendre en charge la douleur qui pourrait survenir au cours de la dénutrition, 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 mis à mort. Lorsque la somme des scores sera supérieure à 7, les animaux seront mis à mort. De plus, en cas de perte de poids supérieure ou égale à 15% sur 3 jours consécutifs ou en cas de non-réponse à des stimuli extérieurs, les animaux seront mis à mort. Pour raffiner le milieu, des édulcorants pourront également être ajoutés dans l'eau de boisson. 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.

Les résultats attendus sont une stimulation de la prise de poids et en particulier de la masse musculaire dans les groupes supplémentés en Lp apportant ainsi des éléments à des études chez l'homme.

16771 Les cancers font partie des maladies les plus complexes à étudier car elles mettent en œuvre de nombreuses interactions cellulaires et moléculaires définissant la notion de microenvironnement tumoral. Parmi les différents types de cancer, les leucémies aiguës (leucémies aiguës lymphoblastiques T, LAL-T ; leucémies aiguës myéloïdes, LAM) sont les plus agressives, en particulier chez les enfants et les personnes âgées. Il s'agit de maladies très rapides qui répondent le moins bien aux traitements actuels.

De plus, ces thérapies sont extrêmement toxiques. Des études récentes ont montré que la progression de ces leucémies dépend aussi de leur capacité d'interaction avec le microenvironnement non atteint de la moelle osseuse, qui produit des facteurs fondamentaux pour la survie des cellules leucémiques et, qui, en même temps s'adaptent à leurs besoins pour favoriser cette survie. Notre projet a pour objectif d'étudier par imagerie la nature de ces anomalies du microenvironnement afin de développer une thérapie ciblée qui puisse normaliser le tissu et promouvoir une meilleure réussite thérapeutique chez les patients.

Pour déchiffrer ce dialogue, nous mettrons en place 4 procédures expérimentales.

L'ensemble de nos expériences nous permettra de suivre les différentes étapes de la progression tumorale et le rôle de la niche vasculaire. Nous allons visualiser les interactions entre cellules leucémiques et niche vasculaire avant et après les approches thérapeutiques, et allons évaluer la destruction progressive des fonctionnalités vasculaires. De plus, nous allons mettre en place un modèle de niche humanisée pour valider nos observations dans les modèles murins.

Cette étude nécessitera un total de 1088 souris pour une période de 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R, afin de limiter le nombre de souris utilisées, nous veillerons à ce que toutes les expériences possiblement réalisables *in vitro* sur modèles cellulaires le soient.

Les expériences montrent que les signaux essentiels aux leucémies dérivent de leur environnement. Dans le cadre du « Remplacement », le laboratoire mettra en place un système de culture 3D qui reproduira la niche et permettra certaines expériences sans utiliser d'animaux. Cependant, celui-ci ne mimant que partiellement ces interactions, le développement de modèle *in vivo* restera nécessaire. Les modèles murins sont bien caractérisés, et nous disposons d'une connaissance détaillée de ces modèles. Nous allons pouvoir tracer les cellules de la niche vasculaire à l'aide de protéines fluorescentes. L'étude des échantillons humains étant limitée, pour étudier les tumeurs humaines nous devons recourir aux souris immunodéficientes, cela représentant un avantage qui ne peut être apporté par aucun autre système disponible à ce jour.

Pour éviter toute souffrance, les procédures d'imagerie intra-vitale et l'implantation d'organoïdes se feront sous anesthésie générale et avec administration préalable d'analgésique. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligées aux souris, leur état fera l'objet d'une surveillance journalière et d'une ré-administration d'analgésique dès que l'animal semblera en situation de souffrance. Les souris seront hébergées dans des cages enrichies avec des nids de coton et des maisons en carton. Enfin si les points-limites préalablement établis sont atteints, l'animal sera euthanasié de façon anticipée afin d'éviter toute souffrance.

A terme, les résultats obtenus grâce à cette étude, permettront de comprendre plus précisément le rôle de la niche micro environnementale dans la progression leucémique et de proposer de nouvelles cibles de traitements anti-tumoraux efficaces pour des patients atteints de leucémies aiguës. L'étude du rôle du microenvironnement est également capitale pour la compréhension de la progression de nombreuses autres formes de cancer.

16772 Les avancées récentes dans la thérapie anti-cancéreuse, notamment l'utilisation de l'immunothérapie et d'anticorps spécifiques des récepteurs inhibiteurs régulant négativement l'activation des globules blancs dans les tumeurs, occupe aujourd'hui une place privilégiée grâce à sa grande spécificité et sa faible toxicité par rapport aux thérapies conventionnelles du cancer. Un bénéfice clinique a été montré dans plusieurs types de cancer, notamment dans le cancer du poumon et de la peau, permettant ainsi

l'amélioration de la maladie pour environ 20 % de la population traitée. Cependant, les marqueurs prédictifs de réponse à ce traitement restent encore mal caractérisés, mais suggèrent une valeur prédictive de l'infiltrat immunitaire tumoral. Cet infiltrat est influencé directement par le microenvironnement tumoral, soit par un contact direct avec les cellules tumorales, soit par contact avec les facteurs sécrétés par les cellules tumorales.

L'objectif de ce projet vise à identifier de nouveaux biomarqueurs de réponse à l'immunothérapie., notamment en validant l'influence des cellules tumorales et des facteurs sécrétés par celles ci sur une population des cellules immunitaires mémoires et résidents de la tumeur (TRM) dans un modèle *in vivo* de souris greffées avec différentes lignées tumorales. Des études récentes menées par différentes équipes ont montré l'implication des cellules immunitaires TRM dans la réponse positive aux traitements par l'immunothérapie. Ce programme vise donc à comprendre l'implication des cellules tumorales dans l'induction des globules blancs résidents dans la tumeur.

Les résultats *in vitro* préalables utilisant une lignée de mélanome murin ont montré que cette lignée peut activer un facteur clé qu'elle secrète et qui est responsable pour l'induction des cellules TRM, contrairement à une lignée ou ce facteur ne peut pas être activé.

La suite de ce travail nécessite l'utilisation d'un modèle murin afin d'étudier *in vivo* le rôle des cellules tumorales dans la potentialisation de la réponse immunitaire antitumorale. L'usage des animaux est indispensable dans ce projet, car cela permettra d'étudier la complexité des mécanismes immunitaires anti-tumoraux et pro-tumoraux. Ces mécanismes étant régulés à l'échelle d'organismes entiers, il n'est pas possible de les étudier en dehors d'animaux vivants. L'utilisation de souris est donc nécessaire dans ce projet afin d'analyser dans un premier temps l'influence des cellules tumorales du mélanome sur la population des cellules immunitaires mémoires et résidentes de la tumeur dans un contexte où il y a présence d'un microenvironnement complexe, vascularisé et plus physiologique que ce que nous pouvons faire *in vitro*. Dans un second temps, le projet prévoit de valider les résultats obtenus dans le mélanome murin, en utilisant le modèle de cancer pulmonaire murin. Le projet prévoit 600 souris dans les 2 ans à venir. Le calendrier expérimental est basé sur une expérience chaque 4 semaines. Cela nous permettra d'analyser les résultats et de modifier le protocole suivant les résultats précédents obtenus afin de réduire le nombre d'expériences et de souris. Les souris seront greffées en sous-cutanée avec quatre lignées tumorales (mélanome murin ou cancer pulmonaire murin) puis traitées ou non avec une immunothérapie dès l'apparition de tumeurs (utilisation d'anticorps spécifiques des récepteurs inhibiteurs, ou utilisation d'un vaccin composé d'un peptide et d'un adjuvant). Pour chaque injection, une anesthésie locale sera pratiquée. Les souris seront suivies quotidiennement pour vérifier leur bien-être. Les mesures poids des souris et taille des tumeurs seront réalisées pour vérifier que les souris n'arrivent pas aux points limites définis. De plus, dès que les souris commenceront à présenter une perte de poids, même minime, de la nourriture en gel sera ajoutée dans leur cage. Suite au sacrifice des souris, l'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs sera analysée.

16773 La maladie de Parkinson (MP) est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche environ 1% de la population après 65 ans. En France, 8 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année et, compte tenu du vieillissement de la population, l'incidence de la maladie progresse. Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique par un ralentissement moteur et des tremblements, apparaissant après une longue phase asymptomatique. Au niveau cérébral, les symptômes ont été associés à une perte de neurones produisant la dopamine dans une région profonde du cerveau appelée « substance noire ». La dégénérescence de ces neurones serait favorisée par des facteurs génétiques et environnementaux mais les mécanismes sous-jacents, vraisemblablement multiples, restent pour l'instant mal connus. De nouvelles données suggèrent que l'accumulation anormale d'une protéine, dénommée l'alpha-synucléine (α -syn) dans les neurones, serait une des causes de la mort des neurones dopaminergiques. Ce mécanisme est considéré comme central dans la genèse et l'évolution de la maladie.

Dans ce projet, un modèle de la maladie de Parkinson basé sur la surexpression d'alpha-synucléine dans le cerveau des rongeurs (*Rattus Norvegicus*) sera utilisé. Il récapitule à la fois les caractéristiques physiopathologiques et les principaux symptômes de la maladie de Parkinson observés chez l'Homme.

L'objectif de notre étude est in fine d'évaluer le potentiel thérapeutique neuroprotecteur de nouvelles molécules en développement dans des protocoles d'administration chronique. En se basant sur les données cliniques qui mettent en évidence des modifications de l'activité cérébrale chez les patients atteints de la MP, nous proposons dans ce projet d'utiliser l'électroencéphalographie (EEG) comme technique d'investigation de biomarqueurs pertinents et translationnels pour l'identification de nouvelles molécules anti-parkinsonniennes.

Pour ce projet, nous allons utiliser 9 lots, avec pour chaque lot 40 rats, soit 360 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. 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. 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 étape. 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. Cette grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance et de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint.

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.

16774 Le développement précoce de l'embryon, de la fécondation à l'implantation, représente une période d'une grande complexité impliquant la coordination de mécanismes clés comme la mise en route du génome de l'embryon et l'établissement des 1eres différenciations cellulaires. Cette phase de développement préimplantatoire, pour l'embryon de mammifères, peut être obtenue *in vitro*. Chez l'être humain, les naissances issues de l'assistance médicale à la procréation représentent une part non négligeable des naissances totales (2.4% en France en 2015). Chez les mammifères d'élevage, le recours à la fécondation et au développement *in vitro* de l'embryon est en constante augmentation afin d'optimiser au mieux les schémas de sélection et d'obtenir les meilleures performances. Aussi bien chez l'être humain que chez l'animal, l'objectif est de produire des embryons de bonne qualité et de sélectionner l'embryon au meilleur potentiel d'implantation et de développement pour obtenir la naissance d'un individu en bonne santé. Des perturbations de l'environnement pendant le développement précoce de l'embryon affectent son développement, ont des effets observables après la naissance et un impact sur le phénotype et la santé de l'adulte. On parle de programmation. L'embryon préimplantatoire est sensible à son environnement. *In vivo*, une modification de l'alimentation maternelle (sous-nutrition, régime pauvre en protéine) imposée uniquement pendant les 1ers jours de la gestation induit des défauts cardiaques et métaboliques de la descendance après la naissance. *In vitro*, l'embryon est produit dans des conditions de culture très différentes de l'environnement naturel et est contraint de s'adapter à une large variété de conditions de culture (nutriments, température, concentration en oxygène, volume, lumière ...). Seuls les embryons capables de s'adapter à ces conditions se développent et sont sélectionnés pour un transfert utérin, sans que l'on ne connaisse complètement ni les mécanismes mis en jeu ni les conséquences des adaptations auxquelles les embryons ont dû se livrer.

Notre projet concerne l'étude des toutes premières étapes du développement des embryons depuis la fécondation jusqu'à la mise en place des premières différenciations cellulaires (cellules qui composeront le futur individu, cellules qui composeront le futur placenta). Il s'agit en particulier de caractériser l'impact des conditions de culture *in vitro* comme la composition du milieu de culture et le taux d'oxygène sur le développement de l'embryon. Nous avons démontré au cours des deux dernières décennies que le lapin représente un modèle de choix pour l'étude du développement embryonnaire précoce des mammifères. Cette étude sera donc effectuée chez le lapin, aucun modèle *in silico* ou cellulaire ne permettant à l'heure actuelle de remplacer, de reproduire la complexité du développement embryonnaire. Nous restons cependant très attentifs aux éventuels développements de nouvelles

technologies qui permettraient de remplacer en partie l'utilisation de l'embryon de lapin. Le nombre d'animaux impliqués dans chaque expérimentation est réduit au maximum grâce aux techniques de super-ovulation (stimulation hormonale permettant d'obtenir un plus grand nombre d'embryon par lapine), techniques maîtrisées chez cette espèce. Nous nous engageons également à travailler au perfectionnement des techniques utilisées, en fonction de l'amélioration des technologies, de façon à réduire le nombre d'embryons nécessaires aux études et ainsi réduire le nombre d'animaux impliqués.

Un enrichissement du milieu est mis en place afin de favoriser le bien-être des animaux, par l'apport d'objets (balles, chaînettes, mezzanines, jouets en polypropylène). Les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux d'avoir des contacts visuels et équipées de mezzanine pour optimiser l'espace de vie.

Une semaine avant le début des expérimentations, les animaux sont déplacés dans la salle d'hébergement dans le but de les accoutumer aux passages plus réguliers d'expérimentateurs ce qui limitera leur stress pendant la durée de l'expérimentation. En cas de comportement anormal (l'animal ne mange plus, il est apathique, il présente une posture anormale, diarrhée ...), un avis est demandé à la structure bien-être animal et aux vétérinaires. Les recommandations du vétérinaire sont alors suivies pour soigner l'animal (antibiothérapie par exemple). Si le comportement ne s'améliore pas l'animal est euthanasié.

Le nombre de lapins impliqués dans ce projet a été calculé de façon à le réduire au maximum tout en restant compatible avec l'utilisation des tests statistiques non paramétriques permettant l'interprétation des résultats. Il sera de 1200 animaux sur 5 ans.

16775 Les cancers font partie des maladies les plus complexes à étudier car elles mettent en œuvre de nombreuses interactions cellulaires et moléculaires définissant la notion de microenvironnement tumoral. Parmi les différents types de cancer, les leucémies aiguës (leucémies aiguës lymphoblastiques T, LAL-T ; leucémies aiguës myéloïdes, LAM) sont les plus agressives, en particulier chez les enfants et les personnes âgées. Il s'agit de maladies très rapides qui répondent le moins bien aux traitements actuels.

De plus, ces thérapies sont extrêmement toxiques. Des études récentes ont montré que la progression de ces leucémies dépend aussi de leur capacité d'interaction avec le microenvironnement non atteint de la moelle osseuse, qui produit des facteurs fondamentaux pour la survie des cellules leucémiques et, qui, en même temps s'adaptent à leurs besoins pour favoriser cette survie. Notre projet a pour objectif d'étudier par imagerie la nature de ces anomalies du microenvironnement afin de développer une thérapie ciblée qui puisse normaliser le tissu et promouvoir une meilleure réussite thérapeutique chez les patients.

Pour déchiffrer ce dialogue, nous mettrons en place 4 procédures expérimentales.

L'ensemble de nos expériences nous permettra de suivre les différentes étapes de la progression tumorale et le rôle de la niche vasculaire. Nous allons visualiser les interactions entre cellules leucémiques et niche vasculaire avant et après les approches thérapeutiques, et allons évaluer la destruction progressive des fonctionnalités vasculaires. De plus, nous allons mettre en place un modèle de niche humanisée pour valider nos observations dans les modèles murins.

Cette étude nécessitera un total de 1088 souris pour une période de 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R, afin de limiter le nombre de souris utilisées, nous veillerons à ce que toutes les expériences possiblement réalisables *in vitro* sur modèles cellulaires le soient.

Les expériences montrent que les signaux essentiels aux leucémies dérivent de leur environnement. Dans le cadre du « Remplacement », le laboratoire mettra en place un système de culture 3D qui reproduira la niche et permettra certaines expériences sans utiliser d'animaux. Cependant, celui-ci ne mimant que partiellement ces interactions, le développement de modèle *in vivo* restera nécessaire. Les modèles murins sont bien caractérisés, et nous disposons d'une connaissance détaillée de ces modèles. Nous allons pouvoir tracer les cellules de la niche vasculaire à l'aide de protéines fluorescentes. L'étude des échantillons humains étant limitée, pour étudier les tumeurs humaines nous

devons recourir aux souris immunodéficientes, cela représentant un avantage qui ne peut être apporté par aucun autre système disponible à ce jour.

Pour éviter toute souffrance, les procédures d'imagerie intra-vitale et l'implantation d'organoïdes se feront sous anesthésie générale et avec administration préalable d'analgésique. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, leur état fera l'objet d'une surveillance journalière et d'une ré-administration d'analgésique dès que l'animal semblera en situation de souffrance. Les souris seront hébergées dans des cages enrichies avec des nids de coton et des maisons en carton. Enfin si les points-limites préalablement établis sont atteints, l'animal sera euthanasié de façon anticipée afin d'éviter toute souffrance.

A terme, les résultats obtenus grâce à cette étude, permettront de comprendre plus précisément le rôle de la niche micro environnementale dans la progression leucémique et de proposer de nouvelles cibles de traitements anti-tumoraux efficaces pour des patients atteints de leucémies aiguës. L'étude du rôle du microenvironnement est également capitale pour la compréhension de la progression de nombreuses autres formes de cancer.

16776 La Neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie génétique fréquente (1/3000 naissances) causée par des mutations du gène Nf1. Tous les patients NF1 développent à des tumeurs bénignes des nerfs au niveau de peau (neurofibromes cutanés ; NFc), dont le nombre peut atteindre des milliers. De plus, une partie d'entre eux développera des neurofibromes plexiformes (NFp) au niveau des nerfs profonds qui, dans certains cas peuvent se transformer en tumeurs malignes des nerfs (TMGNs). Malgré des avancées considérables qui ont été réalisées, en grande partie grâce à l'élaboration des modèles animaux qui récapitulent certains aspects de NF1, il n'existe aucun traitement pour prévenir ou bloquer le développement des neurofibromes et empêcher leur transformation en TMGN.

Notre équipe a élaboré le modèle de souris qui porte la mutation du gène NF1 dans des cellules qui sont à l'origine des neurofibromes (Nf1 KO). Ces animaux développent spontanément, à partir de 12 mois, les NFc et NFp. L'analyse de ces souris nous a conduit à découvrir que le trauma mécanique de peau accélère le développement des NFc. Récemment, nous avons découvert que chez 70% des animaux Nf1 KO les NFp se transforment spontanément en TMGNs ce qui en fait l'unique modèle animal de transformation maligne spontanée. Enfin, nous avons découvert que comme chez les patients NF1, cette transformation passe par un état transitoire, dit dysplasique (dNFs), qui reste mal caractérisé, mais dont la compréhension nous paraît d'importance capitale pour le diagnostic précoce et le traitement des neurofibromes en cours de transformation.

Notre projet inclut 4 procédures :

- 1) étudier l'efficacité de 2 classes des molécules permettant de bloquer le développement de la maladie
- 2) étudier le mécanisme de la transformation maligne en réalisant des greffes de tumeurs sur des souris immunodéprimées
- 3) analyser le rôle d'inflammation et des pathogènes présents dans la salive sur le développement des neurofibromes
- 4) utiliser une lignée de souris possédant un marqueur fluorescent pour suivre l'évolution des neurofibromes

La réalisation de cette étude fait appel à l'utilisation de 310 souris.

La stratégie de conception des expériences a pour vocation de répondre de manière non ambiguë à des questions clés liées à la physiopathologie de la NF1 afin d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques tout en respectant la règle de 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner).

Pour la Réduction ; Le nombre et le génotype des souris qui seront utilisées dans chaque procédure ont été défini en prenant en compte : (i) les variations phénotypiques (toutes les souris mutantes ne développent pas spontanément des neurofibromes) entre animaux de même génotype, (ii) la fréquence d'évolution spontané (70% des cas) des neurofibromes en tumeurs malignes, (iii) les données bibliographiques qui portent sur des expériences similaires, (iv) les discussions avec des cliniciens spécialistes de la NF1.

Pour le Remplacement ; il s'agit de l'unique modèle animal qui récapitule le développement spontané des neurofibromes et leur transformation maligne. Les études décrites dans ce projet ne peuvent être donc accomplies avec un autre modèle *in* ou *ex vivo*.

Pour le Raffinement ; Nous utiliserons un antalgique local pour les greffes sous-cutanées de cellules, nous surveillerons régulièrement l'état de santé des animaux afin de déceler tout signe de souffrance avérée (prostration, isolement, léthargie, perte de poids supérieure à 10% en 24h, poils hérissés) afin d'effectuer une mise à mort compassionnelle

Pour toutes les expériences qui nécessitent des analyses statistiques nous utiliserons le Test de Student.

16777 Les infections pulmonaires sont fréquentes et atteignent une mortalité de 30% dans leurs formes sévères. Les patients atteints de maladies pulmonaires chroniques ou sous assistance respiratoire sont particulièrement à risque. Les germes en cause sont de plus en plus résistants aux antibiotiques et le traitement de ces infections sévères est à risque d'échec. Le développement de thérapeutiques de soutien ou alternatives aux antibiotiques est un enjeu de santé publique majeur identifié par l'Organisation Mondiale de la Santé.

La Flagelline est une protéine dérivée des bactéries. Elle possède la capacité de stimuler le système immunitaire et augmente l'élimination bactérienne. Elle agit en synergie avec les antibiotiques sur les modèles murins de pneumonie, permettant de guérir l'infection plus rapidement qu'avec l'antibiotique seul. Face à ce constat, il est intéressant de proposer l'utilisation de Flagelline en association au traitement antibiotique, pour réduire leur consommation (en quantité et en durée), ou à visée préventive chez les malades à risque.

L'aérosolthérapie consiste à délivrer directement des molécules thérapeutiques dans les voies respiratoires. Dans le cas des pneumonies, l'administration par aérosol de Flagelline permettrait un ciblage direct et rapide de la zone à traiter, tout en limitant l'activité du traitement aux poumons (afin de réduire les potentiels effets indésirables).

Le but de ce projet est de développer un dispositif pour l'administration de Flagelline sous forme d'aérosol, et de réaliser les études précliniques avant son administration chez l'homme. Cela implique : 1/ d'évaluer le dépôt pulmonaire de la flagelline après aérosolisation pour objectiver les prédictions réalisées *in vitro* et 2/ d'analyser le devenir et l'impact de la flagelline inhalée dans l'organisme. Ces études seront réalisées chez le primate non humain (PNH) dans des conditions proches de la clinique humaine : en ventilation spontanée chez l'animal vigile ou en ventilation artificielle chez l'animal sous anesthésie générale.

Le PNH est le meilleur modèle pour évaluer le dépôt pulmonaire, le devenir et l'impact de la Flagelline inhalée car : 1) c'est une espèce de référence pour les études réglementaires des biomédicaments (médicaments d'origine biologique), 2) avec l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique, 3) le primate a une anatomie pulmonaire et des paramètres respiratoires proches de ceux de l'homme et 4) il permet de tester l'inhalation à la fois en ventilation spontanée et artificielle avec les dispositifs d'aérosol à visée humaine.

Le projet a pour but d'étudier le dépôt, le devenir et l'impact de la Flagelline inhalée chez le PNH ; il durera 3 ans et nécessite un total de 14 animaux.

Les données obtenues sont indispensables avant les premières études chez l'Homme afin d'assurer au mieux la sécurité de l'étude clinique. Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation du PNH. En revanche, les résultats *in vitro* préalables permettront de limiter grandement le nombre de PNH nécessaire à l'interprétation et l'extrapolation des résultats. Pour la mise au point de cette thérapeutique, le nombre d'animaux nécessaire et suffisant est réduit à 14 grâce aux données recueillies *in vitro*.

Nos travaux ne porteront que sur des animaux sains, chez qui nous allons étudier et perfectionner l'administration du produit avant de passer aux essais cliniques. Nos essais vont être réalisés soit chez le primate vigile, soit chez le primate anesthésié. Ces procédures génèrent un stress modéré : nous n'attendons pas d'effet indésirable majeur compte tenu des données obtenues chez la souris et il n'est pas attendu la mise en place d'une réaction immunitaire non désirée. Néanmoins s'il devait y avoir des

effets indésirables, des mesures correctives ont été proposées pour soulager l'animal toujours au détriment de la poursuite de l'étude.

Le plan expérimental établi répond à la règle des « 3R » :

- Remplacer : les résultats *in vitro* préalables permettent de calibrer les différentes expériences *in vivo* afin de limiter le nombre d'animaux nécessaire et d'utiliser d'emblée des posologies et modalités d'administration adaptées.

- Réduire : les animaux seront réutilisés au cours du projet en cas de procédures légères à modérées. Les groupes sont petits (n=3) pour obtenir des données qualitatives sans analyse statistique, qui seront ajoutées à l'ensemble des données obtenues dans le projet pour modéliser mathématiquement le devenir et l'impact de la flagelline inhalée.

- Raffiner : les procédures et prélèvements sont réalisés avec une anesthésie adaptée si besoin. Toutes les procédures sont optimisées pour n'induire aucune détresse ou douleur, ou le cas échéant les supprimer. Les animaux seront hébergés par groupe de 3 en volières (enrichissement social) conformes aux normes en vigueur. Les animaux disposent dans leur hébergement de plateformes surélevées, de tunnels, de jouets et de piscine. L'alimentation couvre les besoins journaliers et est complétée par une distribution de friandises deux fois par jour. La nourriture pourra être cachée dans des jouets pour stimuler la recherche alimentaire. Les friandises distribuées sont différentes d'un jour à l'autre et le matin et le soir.

16778 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare, progressive et irréversible, de mauvais pronostic, avec une survie médiane de 2,5 à 4,5 ans, et une incidence estimée entre 0,2 et 7,4 cas pour 100 000 habitant par an en Europe. Elle est caractérisée par une inflammation pulmonaire et une fibrose principalement localisée dans le tissu interstitiel du poumon. Ainsi altérés, les poumons ne parviennent plus à assurer correctement leur fonction respiratoire.

La cause de fibrose et de la réparation progressive du tissu pulmonaire reste inconnue. A l'heure actuelle, il existe très peu de médicaments contre la fibrose qui permettent de ralentir l'évolution de la maladie, cependant ils présentent des effets secondaires tels que des troubles digestifs chez 60% des patients et l'efficacité sur la mortalité causée par la FPI n'a pas encore été démontrée. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase préclinique qui consiste à étudier l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments à visée anti-inflammatoire et anti-fibrotique. Ce projet a pour but de valider l'établissement d'un modèle de FPI chez la souris par administration de bléomycine et de tester de nouveaux médicaments anti-inflammatoires et anti-fibrotiques. Les molécules pharmacologiques à tester peuvent être administrées par voie orale, intranasale, intrapéritonéale, intratrachéale, intraveineuse ou sous-cutanée, de manière préventive (1h à 28 jours avant induction de la maladie) ou curative (au moment et jusqu'à 28 jours après induction de la maladie) selon les recommandations du laboratoire pharmaceutique ou organisme public donneur d'ordres.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6. L'administration de la Bléomycine à l'animal est faite par voie intratrachéale en une seule prise au jour 0 ou en 2 prises à au jour 0 et jour 4 sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes. La FPI peut aussi être induite par injection sous-cutanée de Bléomycine tous les 2 jours ou tous les jours durant 28 jours maximum car il est prévu de mettre à mort les souris à J28 maximum. Les animaux seront ensuite mis à mort 28 jours maximum après l'induction pour analyser différents paramètres immunologiques et histologiques.

Les examens d'imagerie non invasive par scanner X seront réalisés sur les animaux 21 jours après l'induction de la pathologie pour permettre le suivi de la mise en place de la maladie et le contrôle de l'efficacité des traitements testés.

Avant la mise à mort des souris, la capacité pulmonaire totale ainsi que la résistance des bronches seront mesurés à l'aide d'un pléthysmographe.

En ce qui concerne les dommages attendus, ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës non visible à l'animal, liées au développement de la maladie pulmonaire pouvant être traduite par une perte

de poids, une prostration plus ou moins importante et/ou un poil plus ou moins hérissé. Les signes cliniques peuvent être observés à partir du 6ème jour après induction de la maladie et peuvent durer 5 à 7 jours. Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends sera effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les souris seront hébergées par 5 maximum dans des compartiments de 530 cm² à fond plein sur portoir ventilé (selon les normes d'hébergement détaillées dans l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU). Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur. Les examens d'imagerie sont indolores et seront réalisés sous anesthésie gazeuse.

Le projet se compose de 10 études types incluant chacune 3 groupes de 10 souris animaux soit un total de 300 souris.

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, de la fibrose et de la pathologie ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

-Raffinement : Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et d'éviter au maximum leur douleur au moment de l'expérimentation. Les administrations intratrachéales, intranasale et les examens d'imagerie par scanner seront réalisés sur des animaux anesthésiés. L'imagerie *in vivo* est une méthode non invasive pour l'exploration de la pathologie. 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. La mise en œuvre de l'imagerie par scanner X permet de réaliser 3 temps d'étude avec le même animal ce qui contribue également à la réduction d'animaux.

16779 Le cancer colorectal (CCR) représente chez l'Homme le quatrième cancer le plus fréquent dans le monde avec plus d'un million de morts par an. En France, il représente un problème majeur de santé publique avec 36 000 nouveaux cas recensés chaque année et il est la deuxième cause de décès par cancer.

Les cancers du côlon apparaissent comme un groupe de maladies très hétérogène. Un consortium international d'experts a permis de dégager 4 sous-types de CCR. Il s'agit de la classification CMS (Consensus Molecular System) qui définit 4 groupes caractérisés par des facteurs moléculaires, biologiques et cliniques classés de CMS-1 à CMS-4. Le groupe CMS1 regroupe les CCR qui présentent la meilleure survie sans récurrence; le groupe CMS4, la moins bonne. Le groupe CMS-4 représente environ 20 % des CCR. Il est caractérisé par de nombreuses altérations des fonctions biologiques de l'individu, une activation fréquente du TGF β (facteur de prolifération cellulaire) et une vascularisation de la tumeur. Des études ont également pu mettre en évidence que l'expression de la protéine prion cellulaire (PrPc) était augmentée dans les tumeurs de ce groupe et qu'elle était associée à un mauvais pronostic de la tumeur. Il semble que la protéine prion cellulaire contrôle l'expression de gènes associés au groupe CMS-4.

Les traitements actuels proposés pour les CCR du groupe CMS-4 semblent présenter une faible efficacité, il s'avère donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

En nous basant sur des résultats obtenus *in silico* et *in vitro*, l'objectif du projet est de développer, chez la souris, un modèle préclinique s'approchant du cancer colorectal du groupe CMS-4 qui surexprimera la protéine PrPc. Cela nous permettra d'étudier le rôle et les conséquences de la surexpression de la PrPc sur l'incidence et la progression de la tumeur.

Notre stratégie consiste, à l'aide de modèles de souris transgéniques : i) à inhiber l'expression de la protéine Apc (Adenomatous Polysis Coli), protéine suppresseur de tumeur, dans les cellules de l'intestin et ii) à surexprimer la protéine prion cellulaire humaine dans ces mêmes cellules.

L'inactivation de l'expression de la protéine APC chez la souris induit l'apparition de polypes adénomateux (tumeurs bénignes) dans le colon. La surexpression de la PrPc chez la souris n'induit

pas le développement spontané de tumeurs. Seule la conjonction de ces deux événements, l'inactivation de l'expression de la protéine APC et la surexpression de la PrPc chez une souris, semble aggraver le phénotype.

Pour respecter le principe des 3R :

- Afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, une surveillance quotidienne sera effectuée, en respectant des points limites définis, au-delà desquels les animaux seront euthanasiés. Pour cela une grille de score sera appliquée à chaque souris afin d'évaluer son bien-être et d'appliquer des critères d'arrêts lorsque cela s'avère nécessaire. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les analyses potentiellement stressantes, comme par exemple, les suivis échographiques se feront sous anesthésie générale. L'échographie permet un suivi de la croissance tumorale au cours du temps sans euthanasie des animaux limitant ainsi très fortement le nombre de souris nécessaires. Cette méthode nous permet d'identifier et de faire des études sur des tumeurs de petites tailles, à des stades précoces, évitant la souffrance engendrée par un développement tumoral important.

Une veille scientifique continue sera effectuée afin de ne pas répéter toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

- Un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité, la fiabilité de l'expérience et permettre des tests statistiques entre les différentes conditions. Le projet utilisera 236 souris sur les 5 années d'étude. Ces animaux serviront à la création du modèle préclinique issu du croisement de deux lignées indépendantes. Puis ces animaux permettront l'étude du rôle de la protéine prion dans l'apparition et l'évolution des polypes adénomateux.

L'élevage des souris sera en adéquation avec ce nombre maximum requis.

16780 Les spondyloarthrites sont des rhumatismes inflammatoires fréquents (0,3% de la population française) touchant les articulations, les tendons mais aussi d'autres organes (inflammation des yeux, de la peau et du tube digestif). Les raisons du déclenchement de cette maladie sont à ce jour mal comprises. Il y a parfois l'association d'une susceptibilité génétique et d'un environnement déclencheur comme une infection (exemple Chlamydia), et parfois l'influence de la flore intestinale est suspectée. Pour mieux comprendre le rôle de l'environnement (bactéries pathogènes ou non) dans les spondyloarthrites, nous disposons de souris qui peuvent développer plusieurs formes de spondyloarthrites en fonction de l'agent déclenchant l'arthrite utilisé : infection avec une Chlamydia spécifique des souris pour l'arthrite réactionnelle et injection de sucres dérivés de bactéries comme le curdlane pour la spondylarthrite ankylosante. La grande force de ce modèle est de reproduire assez fidèlement les inflammations (articulaires et autres) des maladies correspondantes chez l'homme.

L'objectif de cette étude est d'étudier le rôle des bactéries de la flore intestinale (microbiote) et des molécules que ces bactéries produisent sur le développement des spondyloarthrites dans nos modèles souris d'arthrite réactionnelle et de spondylarthrite ankylosante. Au cours de cette étude, nous étudierons la variation de la flore intestinale au cours du développement de la maladie. Nous souhaitons aussi modifier cette flore possiblement responsable de la maladie en donnant des compléments alimentaires (prébiotique) à ces souris afin de prévenir l'apparition de ces maladies (suite à l'infection par Chlamydia ou à l'injection de sucres dérivés de bactéries). Ce dernier modèle ne présente que peu de risques biologiques ce qui nous permettra d'utiliser des cages numériques qui quantifient l'activité des souris en l'absence des humains et donc d'évaluer le développement de la maladie sur un plan fonctionnel. L'objectif final est de valider que la modification du microbiote peut influencer sur l'évolution des spondyloarthrites humaines.

Concrètement, pour nos souris, l'apparition de la maladie sera évaluée cliniquement au niveau des articulations et des autres organes atteints, par de l'imagerie, et par histologie après la fin des expériences. L'infection persistante (par Chlamydia ou d'autres bactéries) sera recherchée sur des prélèvements de crottes et des écouvillons vaginaux, par analyse génétique et analyse métabolomique. La mesure de l'activité des souris dans les cages digitales nous permettra de mettre en place un test

fonctionnel permettant d'étudier finement la répercussion de l'arthrite. Ce test une fois validé pourra être utilisé dans d'autres modèles de maladies articulaires chez la souris (dont l'arthrose).

Ce projet s'inscrit dans la règle des 3R :

Remplacer : Le développement de cette pathologie est complexe et donc son étude nécessite l'intervention d'un système immunitaire complet et d'articulations fonctionnelles. Des études *in vitro* ne sont donc pas envisageables. Néanmoins nos travaux s'appuient sur des mises au point faites en culture cellulaire.

Réduire : Le projet nécessitera 400 souris sur une période de 5 ans. 10 individus par groupe sont nécessaires pour détecter une différence statistique du score clinique.

Raffiner : Une surveillance quotidienne des souris sera réalisée avec calcul d'un index de score clinique. Au-delà d'un score prédéfini les souris seront retirées de l'étude et mises à mort. La durée maximale des expérimentations est limitée à 12 semaines ce qui permet à la fois aux souris de développer une spondyloarthrite sans atteindre un stade avancé de la maladie : au cours de nos précédentes études réalisées sur ce modèle, il n'a pas été constaté de détérioration de l'état général ni de gêne fonctionnelle majeure chez les souris infectées.

16781 Les complications pulmonaires post-opératoires, telles que l'atélectasie, les pneumonies et la détresse respiratoire aiguë, augmentent significativement la durée de séjour hospitalier chez des patients ayant bénéficié d'une chirurgie thoracique majeure, d'une chirurgie cardiaque ou d'une chirurgie sus-mésocolique (au-dessus du colon transverse). Ces complications sont corrélées avec l'amyotrophie du diaphragme; il en résulte une altération des fibres musculaires conduisant à une atrophie de ce muscle. La stimulation implantée du nerf phrénique permet une contraction du diaphragme et évite ainsi toute dysfonction liée à son atrophie.

Notre projet a pour but de trouver une nouvelle technique de stimulation du nerf phrénique par des électrodes temporaires sur la portion libre de ce nerf, avant sa terminaison dans le diaphragme. Pour cela, nous évaluerons l'efficacité sur les contractions diaphragmatiques d'une électrode mise en place ainsi que la facilité de retrait de cette électrode au bout de deux semaines.

La procédure chirurgicale que nous voulons développer et la stimulation phrénique temporaire par des électrodes amovibles doivent être validées par une expérimentation animale *in vivo* qui ne peut être remplacée par un entraînement sur simulateur ou un modèle *in vitro*.

Le mouton est le meilleur modèle animal permettant d'étudier la stimulation phrénique implantée.

Ce projet d'une durée d'un an utilisera quinze moutons pour étudier l'implantabilité et l'efficacité d'une électrode tubulaire temporaire sur la portion libre des nerfs phréniques droit et gauche. La mise en place des électrodes se fera sous anesthésie générale. L'efficacité des électrodes sera mise en évidence par le sevrage de la ventilation mécanique en les stimulant. Les animaux seront ensuite réveillés et libérés dans leur enclos pendant 15 jours, avec les électrodes en place et non stimulées.

Au quinzième jour, les animaux seront de nouveau endormis sous anesthésie générale. L'efficacité des électrodes sera de nouveau testée comme décrit dans le paragraphe précédent. Puis la facilité de retrait des électrodes sera testée.

Les animaux seront sacrifiés à la fin de la seconde intervention pour effectuer des analyses histologiques complémentaires sur la portion du nerf stimulé afin de vérifier son intégrité après ablation. Cette étude est prévue sur une année.

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.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des moutons. Au score clinique, est adjointe une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet. Les procédures se font sous anesthésie générale et des antalgiques sont utilisés systématiquement. Un niveau de douleur élevé entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal.

A terme, l'aboutissement de cette phase expérimentale devrait permettre de mettre en place un programme hospitalier de recherche clinique sur l'impact de la stimulation post-opératoire du nerf phrénique sur la morbi-mortalité hospitalière après chirurgie thoracique et cardiaque.

16782 L'étude des effets pharmacologiques d'un candidat médicament sur le temps de saignement vise à caractériser ses propriétés pharmacologiques sur l'hémostase primaire, i.e. à évaluer le temps nécessaire à la formation d'un clou plaquettaire provoqué par une incision cutanée. Il permet de dépister, par exemple, un risque hémorragique avant toute intervention chirurgicale.

Ces études sont réalisées pour caractériser un effet du fonctionnement plaquettaire (plaquettes sanguines) ou du facteur de von Willebrand (facteur qui intervient dans la formation de liens entre les fibres de collagènes et les plaquettes, donc nécessaire à l'hémostase primaire). L'hémostase est donc l'ensemble des mécanismes permettant d'interrompre un saignement et d'éviter l'hémorragie.

Le principe de cette technique consiste à faire une petite incision cutanée chez l'animal anesthésié. Le sang s'échappera de la plaie et sera repris délicatement au moyen d'un papier absorbant. Le temps pendant lequel le sang s'écoule librement de la plaie sera mesuré à l'aide d'un chronomètre (technique la plus couramment utilisée). Cette technique est très régulièrement citée dans la littérature scientifique et est utilisée chez l'Homme.

Ces études sont réalisées au bénéfice des patients incorporés dans les essais cliniques ou post commercialisation pour prévenir d'éventuels effets indésirables et/ou augmenter la probabilité de tester des candidats médicaments efficaces dans les essais cliniques.

Le rat est l'espèce régulièrement utilisée dans la littérature scientifique pour l'étude de nouveaux candidats médicaments sur le temps de saignement.

Concernant la règle des 3Rs :

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger, incitation au fouissement ...)
- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés par des approches statistiques optimisées.
- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études, à savoir des données relatives à l'efficacité ou aux effets secondaires de candidats médicaments en relation avec les niveaux d'exposition à ces mêmes candidats médicaments.

Les études des effets pharmacologiques de candidat médicament sur le temps de saignement sont réalisées sur l'animal anesthésié. Lorsque le candidat médicament est administré avant le test, les doses testées sont non toxiques et donc non susceptibles d'entraîner, la mort ou des signes d'intolérance. Dans les cas contraires, les animaux moribonds seront mis à mort en concertation avec le vétérinaire du centre et le responsable du projet.

Dans le cas de traitement réitérés avant l'évaluation du temps de saignement, les points limites pour ce projet sont :

- Amaigrissement marqué >20%
- Baisse de la température corporelle (<34°C)
- Signes sévères de douleur ou de détresse
- Saignement non contrôlé

Le test du temps de saignement est classé avec un degré de sévérité légère car l'acte susceptible de générer le niveau de douleur/stress le plus élevé est constitué par l'induction de l'anesthésie et/ou par l'administration du candidat médicament.

Cette étude est réalisée sur des groupes de 6-8 animaux maximum. Cet effectif par groupe correspond au nombre minimum d'animaux nécessaires permettant de révéler les effets recherchés avec la sensibilité statistique requise dans ce type d'étude.

Compte-tenu de la fréquence à laquelle ces études de recherches sont requises, le nombre d'animaux maximum pour le présent projet (5 ans) est de 500 rats.

16783 Depuis la fin de l'année 2019, le « severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 » (SARS-CoV-2) a infecté des millions de personnes à travers le monde et la maladie qui lui est associée, le COVID-19, a déjà fait des dizaines de milliers de morts. Cette pandémie a entraîné un confinement obligatoire dans de nombreux pays.

Le virus est contenu dans des petites gouttelettes en suspension dans l'air expirées par les personnes déjà contaminées. Lorsqu'une autre personne les inspire, le virus rentre dans les voies respiratoires, puis dans les poumons. Par l'intermédiaire de la protéine S (« spike ») exprimée à sa surface, le virus se fixe aux cellules épithéliales de la cavité orale et des voies respiratoires via un récepteur appelé ACE2 et libère son ARN. L'ARN du virus prend le contrôle de la cellule et commence sa réplication puis sa diffusion dans les cellules adjacentes de telle sorte qu'il finit par infecter les cellules épithéliales qui tapissent le fond des alvéoles pulmonaires.

Une réponse immunitaire complexe de l'organisme se met en place. Une de ses composantes est l'activation rapide du système immunitaire inné. Par un mécanisme similaire au virus SARS-Cov de 2003 et MERS-Cov de 2012, la protéine N (« nucléocapside ») du virus SARS-Cov-2 interagit directement avec la molécule MASP-2 du complexe MBL-MASP-2 qui est à l'origine de l'activation/l'interrupteur de la voie dit « lectine » du système du complément, induisant ainsi une suractivation/activation anormalement élevée de cette cascade du complément. Cette voie du complément étant anticorps –indépendante, elle précède dans le temps l'apparition d'une immunité adaptative. Cette cascade culmine en la production terminale d'un facteur soluble appelé le C5a qui diffuse loin du site de l'infection. C5a, en se fixant sur les cellules myéloïdes comme les monocytes et neutrophiles du sang périphérique ou les macrophages grâce à son récepteur C5aR, induit leur recrutement à l'endroit de l'infection et les active. Les cytokines et les chimiokines pro-inflammatoires comme les interleukines sont alors produites en grande quantité. Cette inflammation devient alors hors de contrôle, c'est l'orage cytokinique, qui entraîne un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), pouvant être fatal.

Plusieurs études conduites dans des modèles animaux (souris et macaque) - récapitulant les maladies de type SARS et MERS, qui induisent des affections pulmonaires aiguës, ont montré un effet bénéfique de l'inhibition de la voie de signalisation C5a / C5aR. De plus, une étude réalisée par notre entreprise sur 80 patients atteints de SARS-Cov2 a montré que la concentration en C5a était fortement augmentée dans les cas les plus sévères et qu'elle était corrélée à la sévérité de la maladie. En empêchant C5a de se fixer sur les récepteurs C5aR présents à la surface des cellules myéloïdes, il pourrait être possible de bloquer la cascade inflammatoire et d'empêcher les conséquences dévastatrices de l'orage cytokinique.

Nous avons développé un anticorps monoclonal qui a une forte affinité pour le récepteur C5aR présent sur les cellules myéloïdes. Il bloque ainsi la cascade inflammatoire, inhibe la migration et l'activation des neutrophiles, et en empêchant la sécrétion des cytokines inflammatoires, empêcherait l'orage cytokinique de survenir. Une étude clinique de phase 2 est actuellement en cours pour l'évaluation de l'efficacité de cet anticorps dans les pneumonies sévères induites par COVID-19.

Le présent projet consiste à valider l'efficacité du blocage du récepteur C5aR dans un modèle murin de SDRA léger et d'investiguer son mode d'action dans ces affections. Nous envisageons d'évaluer l'efficacité de cet anticorps dans des souris C57/BL6 ainsi que dans des souris génétiquement modifiées (souris KI huC5aR/KO muC5aR) qui auront un SDRA induit par inhalation de gouttelettes de LPS, de C5a ou d'IgG de lapin anti-BSA. Dans ce dernier cas, l'instillation sera suivie d'une injection intraveineuse de BSA.

Le projet visera à évaluer l'efficacité de l'anticorps à :

- bloquer le recrutement de cellules myéloïdes aux poumons ;
- bloquer la mise en place de l'orage cytokinique dans les poumons ;
- bloquer l'augmentation de perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire associée avec le SDRA.

Différent settings thérapeutiques seront évalués : en préventif (en amont de l'induction du SDRA), et en thérapeutique (quelques heures après l'induction du SDRA).

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 du blocage par notre anticorps 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.

Les instillations intranasales seront réalisées sous anesthésie générale (gazeuse à l'isoflurane). Une surveillance attentive de l'apparence et du comportement des animaux (prostration et difficultés respiratoires) dans les temps précoces suivant le réveil (30 minutes) permettra de déterminer si l'instillation des différents composés impacte le bien-être animal. Si oui, l'animal sera sacrifié selon la procédure décrite en paragraphe 3.3.3. La procédure étant courte (maximum 19h), aucun autre suivi ne sera effectué.

Des prélèvements de sang au niveau du sinus rétro-orbital et sous anesthésie gazeuse (isoflurane) ou après injection du cocktail kétamine/xylazine (pour les phases terminales) pourront être réalisés à différents temps expérimentaux préétablis, selon les recommandations du SBEA interne, en vue d'analyses pharmacocinétiques, de dosage cytokiniques, ou d'analyses cellulaires en cytométrie en flux par exemple.

Le nombre total d'animaux est évalué au maximum à 3000 sur 2 ans.

16784 Les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) sont des pathologies constituant un véritable enjeu de santé publique, puisqu'elles sont particulièrement handicapantes, incurables actuellement, et les approches de prise en charge des symptômes sont d'une efficacité relative. Ces pathologies sont multifactorielles et complexes. Elles se manifestent par des poussées inflammatoires plus ou moins longues et fréquentes selon les patients. Dans ce contexte, comprendre les facteurs impliqués dans le déclenchement des MICI est indispensable pour établir de nouvelles prises en charge des patients, en particulier des approches préventives chez les patients à risque (prédisposés génétiquement en particulier).

Des études épidémiologiques indiquent qu'un apport calorique important et le surpoids semblent être associés avec un risque augmenté de MICI et des prises en charge plus compliquées des patients. De plus, des études expérimentales sur des souris transgéniques obèses ont confirmé une exacerbation de l'inflammation. A l'inverse, une diminution de l'apport calorique semble avoir un effet bénéfique sur des pathologies inflammatoires. Compte tenu de ces observations, la compréhension des mécanismes liant l'apport calorique et l'inflammation intestinale est importante.

Notre étude consiste d'une part à comparer la sévérité de l'inflammation intestinale induite par un agent colitogène chez des souris préalablement soumises à différents régimes alimentaires hypercaloriques ou hypocaloriques, d'autre part à identifier les mécanismes cellulaires et physiopathologiques responsables de la modulation de la sévérité de l'inflammation. Compte tenu des différences entre homme et femme au niveau de la physiologie du stockage et de l'utilisation des composés énergétiques, nous prévoyons d'étudier parallèlement des souris mâles et femelles.

La physiologie de l'intestin est complexe et la réponse inflammatoire implique de nombreux acteurs présents dans l'ensemble de l'organisme d'où l'utilisation de modèle *in vivo*, sur des souris car il existe des modèles transgéniques permettant d'étudier les maladies métaboliques en lien avec le surpoids, ce qui permettra de faire des liens avec ces modèles, ou d'envisager des poursuites de notre travail avec ces modèles transgéniques.

1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche *in vitro* car l'étude porte sur un régime alimentaire et la nutrition fait intervenir des processus physiologiques complexes qui interagissent.

2. Réduction : l'étude portera sur des souris mâles de laboratoire, réparties en 2 groupes d'études dans l'objectif d'étudier l'effet aggravant de régimes hypercaloriques chez des souris Wild Type (C57Bl6) en comparaison aux souris transgéniques NOD2-/- : régime hyperlipidique et hyperglucidique

Chaque groupe sera subdivisé en sous-groupes : traités ou non traités avec l'agent colitogène (DSS). Ainsi, 60 souris seront nécessaires dans cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

3. Raffinement : toutes les procédures expérimentales (régime spécial, traitement pro-inflammatoire, coloscopie) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal et les coloscopies se feront sous anesthésie générale. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé 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 de plus de 20%, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation). En fin de protocole, les animaux seront euthanasiés et les organes prélevés pour permettre des analyses biologiques.

16785 Le cancer est une des causes principales de mortalité en France et dans les pays industrialisés ce qui démontre la nécessité de trouver encore de nouveaux traitements pour lutter contre cette maladie

Dans le cadre de la Recherche sur le cancer, et plus particulièrement dans le domaine de la biologie, on distingue 2 types d'approches scientifiques, les études *in vitro* et les études *in vivo*.

Les tests *in vitro* utilisent soit des protéines soit des cellules tumorales d'origine humaine ou murine qui permettent de sélectionner un composé parmi plusieurs molécules. Ces modèles confortent les hypothèses de cohérence entre le composé candidat et sa cible. De plus les études sur modèles cellulaires permettent de sélectionner les cellules qui seront utilisés dans les modèles animaux.

Dans le domaine de la cancérologie, plusieurs approches *in vivo* peuvent être envisagées en fonction de la cible thérapeutique :

- Implantation de cellules tumorales humaines chez des souris ou des rats dont le système immunitaire est déficient en sous-cutané ou dans l'organe d'origine de la tumeur. Ces cellules sont sélectionnées au préalable sur des tests *in vitro*. Ces modèles permettent de cibler directement la cellule cancéreuse. Par exemple la relation entre la présence du composé dans la tumeur après administration à l'animal et son activité sur la cible peut être établi.

- Implantation de cellules tumorales de rongeur chez des animaux de la même souche dont le système immunitaire est intact. L'environnement tumoral (cellules immunitaires, endothéliales, fibroblastes...) favorise le développement de la tumeur et est devenu également une cible thérapeutique.

- Injection de cellules tumorales par voie systémique ou dans la rate pour mimer le phénomène de métastatisation.

- Des cancers « spontanés » développés par des souris ou des rats génétiquement modifiées ou chimiquement induits. Ces modèles permettent d'étudier le développement tumoral qui va mimer des étapes de la carcinogenèse chez l'Homme.

Mise en œuvre des 3Rs:

Remplacement: Les tests *in vitro* sur des protéines purifiées et sur cellules tumorales permettent de sélectionner les composés d'intérêt. Cependant, aucune méthode *in vitro* ne permet de remplacer l'évaluation du composé sélectionné chez l'animal car les tests *in vitro* ne peuvent représenter la complexité de l'organisme entier.

Réduction : Cependant, la sélection de composés d'intérêt pendant la phase *in vitro* permet de réduire le nombre d'études *in vivo* donc le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Le raffinement des plans expérimentaux repose sur une optimisation du nombre d'animaux grâce à des études statistiques prévoyant le nombre d'animaux par groupe adéquat.

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. Des critères d'arrêt anticipé spécifiques pour les animaux porteurs

de tumeurs 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 nécessitera de recourir à environ 112 490 rongeurs (souris et rats) sur cinq ans.

16786 L'étude des effets pharmacologiques d'un candidat médicament sur la thrombose veineuse vise à caractériser ses propriétés pharmacologiques sur la coagulation, appréciée par la formation ou non d'un caillot (thrombus) au niveau d'une veine.

La thrombose veineuse profonde est une maladie relativement fréquente et son incidence s'accroît avec l'âge pour atteindre un taux de 3 nouveaux cas par an et pour 1000 personnes chez les octogénaires.

Ces études sont réalisées pour caractériser un effet anticoagulant, i.e. anti-thrombotique (effet thérapeutique) ou un effet thrombotique (effets indésirables). Le principe de cette technique consiste à détecter la formation ou non d'un caillot au niveau d'un sac veineux. Pour cela, une veine (par exemple abdominale, jugulaire) sera isolée puis ligaturée de façon à former un sac veineux. L'évaluation de la thrombose (qualitative ou quantitative) est réalisée par ouverture de celui-ci. Cette technique est très régulièrement citée dans la littérature scientifique.

Ces études sont réalisées au bénéfice des patients incorporés dans les essais cliniques ou post commercialisation pour prévenir d'éventuels effets indésirables et/ou augmenter la probabilité de tester des candidats médicaments efficaces dans les essais cliniques.

Le rat et le lapin sont les espèces régulièrement utilisées dans la littérature scientifique pour l'étude de nouveaux candidats médicaments sur la thrombose veineuse.

Concernant la règle des 3Rs :

- les animaux bénéficient d'un enrichissement de leur milieu d'hébergement (jouets, objets à ronger, incitation au fouissement ...)
- le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum pour permettre la détection des effets recherchés par des approches statistiques optimisées.
- actuellement, il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'obtenir toutes les informations collectées grâce à ces études, à savoir des données relatives à l'efficacité ou aux effets secondaires de candidats médicaments en relation avec les niveaux d'exposition à ces mêmes candidats médicaments.

Les études des effets pharmacologiques de candidat médicament sur la thrombose veineuse sont réalisées sur l'animal anesthésié. Il n'y a pas de points limites définis dans ce type d'étude, cependant, la procédure peut être interrompue avant son terme si des signes de réveil et/ou douleur apparaissent au cours de l'anesthésie et qu'il ne soit pas possible de les contrecarrer.

Le test de la thrombose veineuse est classé en procédure sans réveil. En termes de souffrance, l'acte susceptible de générer le niveau de douleur/stress le plus élevé est constitué par l'induction de l'anesthésie.

Cette étude est réalisée sur des groupes de 6-8 animaux maximum. Cet effectif par groupe correspond au nombre minimum d'animaux nécessaires permettant de révéler les effets recherchés avec la sensibilité statistique requise dans ce type d'étude.

Compte tenu de la fréquence à laquelle ces études de recherches sont requises, le nombre d'animaux maximum pour le présent projet (5 ans) est de 300 rats et 300 lapins.

16787 La résistance aux antibiotiques est une problématique de santé majeure. Longtemps circonscrite au domaine médical, l'antibiorésistance a ensuite concerné le secteur animal par la médecine vétérinaire et par la surveillance de la chaîne alimentaire. Plus récemment, le secteur dit environnemental a été pris en considération, bouclant ainsi une approche globale (One Health) justifiée par l'interconnexion des milieux et des hôtes via de multiples voies et modalités de transmission de bactéries résistantes ou de gènes de résistance.

Cependant, la prise en compte de l'environnement par les politiques publiques est encore limitée du fait d'un manque de connaissances sur un milieu qui se révèle très hétérogène et complexe dans lequel interagissent les éléments (sol, air eau) et la faune y vivant. Des études assez nombreuses existent sur la faune sauvage mais elles décrivent surtout des cas isolés. Ce projet a pour objectif de dépasser ce cadre descriptif en proposant de générer des connaissances sur une espèce particulière, le renard roux (*Vulpes vulpes*), qui pourrait constituer une sentinelle ou espèce indicatrice de la présence de bactéries porteuses de résistance aux antibiotiques dans l'environnement et de son évolution. En haut de la chaîne alimentaire, le renard roux, très largement répandu dans de nombreux milieux en Europe, présente une grande capacité d'adaptation et peut vivre dans des milieux à l'interface avec l'homme et les animaux domestiques. Notre projet consiste à caractériser la charge en antibiorésistance dans les fécès de renards roux vivant dans différents habitats (péri-urbain, élevage et culture) et son évolution en fonction des saisons. En complément, une expérimentation sera menée sur 6 renards argentés ayant ingéré une bactérie non pathogène porteuse de gènes de résistance aux antibiotiques et 6 renards témoins, ceci afin de déterminer la durée de portage digestif et d'excrétion. La procédure n'aura pas de retentissement sur l'état de santé des 12 animaux (témoins et ceux ingérant la bactérie) qui ne seront pas manipulés, qui resteront dans leur environnement avec enrichissements et qui resteront en vie en fin de procédure. Il n'existe pas de possibilité de remplacement car le sujet est encore inconnu.

16788 Le cancer de la prostate et le mélanome de la peau sont parmi les 5 cancers les plus fréquents en France. Ces cancers se développent lentement et touchent principalement des patients de plus de 50 ans. Ces cancers sont souvent la conséquence de mutation génétique, telles que les mutations des gènes PTEN et/ou P53 et d'une réponse inappropriée du système immunitaire. Malgré les progrès spectaculaires réalisés ces dernières années en immunothérapie des cancers, de nombreux patients continuent à souffrir de cancers tels que celui de la prostate ou le mélanome. L'absence de traitement efficace contre ces cancers pose un problème de santé publique. et la découverte de nouvelles thérapies est une priorité. Une meilleure compréhension de l'évolution de la réponse immune au cours du développement tumoral devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles immunothérapeutiques. L'objectif du projet est d'étudier le système immunitaire de deux modèles murins permettant de reproduire les différents stades du développement tumoral du cancer de la prostate et du mélanome chez l'homme afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles d'immunothérapie et ainsi contribuer à soigner les patients atteints de cancer.

Dans ce projet, nous allons respecter la règle des 3R

REMPACEMENT: Il n'existe à ce jour aucune alternative à l'expérimentation animale lorsqu'il s'agit de modéliser les processus complexes de développement tumoral du cancer de la prostate et du mélanome cutané, qui sont dépendants d'une interaction forte entre le microenvironnement de l'organe, le système immunitaire et les événements génétiques. Afin d'étudier la dynamique du système immunitaire dans l'environnement tumoral de la phase précoce à la phase métastatique, mais aussi pour tester de nouvelles immunothérapies, l'utilisation de modèles murins est cruciale. Nous proposons dans ce projet d'utiliser deux modèles murins récapitulant les étapes du développement du cancer de la prostate et du mélanome observées chez l'homme.

RAFFINEMENT: Toutes les procédures expérimentales du projet sont réalisées en tenant compte du bien-être animal dans le strict respect des réglementations en vigueur et en étroite collaboration avec la structure du bien-être animale de notre établissement. Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les souris afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal être" de l'animal. Une anesthésie générale sera utilisée durant les procédures expérimentales (prélèvement sanguin, transplantation et castration). Nous vérifierons l'état de santé des souris quotidiennement : tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques sera relevé et évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront mis à mort. Durant l'ensemble de l'étude, les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlé : température et ventilation régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie), avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Les souris seront

maintenues en groupes de 3 à 5 animaux par cage. L'environnement est enrichi par des dômes en carton ou du coton.

REDUCTION: Basé sur notre expérience antérieure et sur la nécessité d'avoir des tests statistiques robustes pour publier nos travaux et les partager avec la communauté scientifique, le design du projet a été réalisé de façon à répondre à notre objectif avec le nombre minimal nécessaire de souris.

Le nombre d'animaux nécessaires pour le projet de recherche sur 5 ans s'élève à 3200 animaux.

16789 L'entérite nécrotique à *Clostridium perfringens* est une maladie très présente dans les élevages aviaires. C'est l'affection la plus sévère décrite parmi les entérites dues à des clostridies. *C. perfringens* étant normalement présent dans l'environnement et dans le tube digestif des poulets, la maladie se déclare notamment suite à un dysfonctionnement de la flore intestinale ou un dommage des muqueuses. Les facteurs conduisant à l'implantation de la bactérie et à la génération de lésions sont encore mal connus.

Ce projet fait suite à un projet déposé en 2019 non abouti visant à mettre au point un modèle expérimental de reproduction de l'entérite nécrotique à *C. perfringens* chez le poulet de chair. Le présent projet a pour objectif de tester et d'ajuster de nouvelles modalités afin de disposer d'un modèle valide et reproductible, dont la co-infection avec une coccidie (parasite intestinal unicellulaire) qui permet l'implantation de la bactérie dans le tube digestif et l'obtention de lésions caractéristiques de l'entérite nécrotique. Les paramètres associés à tester sont les suivants :

- l'environnement des oiseaux pouvant influencer la composition de la flore digestive (plancher grillagé ou recouvert de carton, pipettes ou cloches pour l'abreuvement),
- la densité des oiseaux dans les cages (20 ou 30 par m²) influençant la contamination environnementale et les contacts entre individus, - l'âge des coccidies,
- les doses et la fréquence des inoculations.

En reprenant l'approche du précédent projet, trois étapes sont envisagées :

1. Etape de mise au point pour obtenir les lésions caractéristiques souhaitées,
2. Etape d'optimisation en sélectionnant la modalité la plus concluante dans le premier essai et en affinant les paramètres,
3. Etape de validation et de confirmation de la reproductibilité du modèle.

Pour la mise au point du modèle, deux essais sont prévus. Pour chaque essai, 120 poulets seront utilisés dans des lots avec des modalités indiquées plus haut.

Pour l'étape d'optimisation, 160 poulets seront utilisés, avec un deuxième essai avec les mêmes effectifs (160 sujets) mais des modalités différentes en cas de résultats non satisfaisants. Enfin, pour l'étape de validation, 60 sujets seront utilisés. Au total, 620 animaux au maximum seront utilisés pour les trois étapes du projet.

Il n'existe actuellement pas de modèle sans passer par les animaux cibles de cette affection, à savoir les poulets. Les mécanismes de la pathogénie de l'entérite nécrotique sont mal connus, car ils sont complexes et nécessitent l'implantation et la multiplication de la bactérie puis la sécrétion de toxines.

Aucun modèle *in vitro* n'est actuellement disponible ni étudié à notre connaissance. Les différentes étapes ont été conçues pour utiliser un nombre d'animaux minimal mais suffisant pour s'affranchir des variations interindividuelles et obtenir des résultats permettant de calculer des pourcentages de réussite.

Le modèle d'infection expérimentale est équipé des raffinements et d'enrichissement suivants : élevage en groupes homogènes, papier cartonné ondulé sur tout ou partie du plancher des cages pour soulager les aplombs, cordelettes suspendues, rampes d'abreuvement par pipettes qui servent également de perchoirs, éclairage naturel complété par un éclairage artificiel en jours courts. Ce modèle permettra de tester des solutions alternatives aux antibiotiques employés aujourd'hui pour contrôler l'entérite nécrotique en élevage.

16790 Les neuropathologies de type Tauopathies sont des maladies neurodégénératives chroniques caractérisées par une accumulation pathologique d'agrégats de protéine Tau dans le cerveau, qui souffrent d'un vide thérapeutique. L'existence de formes génétiques de ces maladies a permis d'identifier des mutations pathologiques dans le gène de la protéine Tau. Il a ainsi été possible de développer des modèles de souris transgéniques portant des mutations du gène de la protéine Tau et présentant une accumulation progressive d'agrégats de protéine Tau et un développement de déficits comportementaux (cognitifs et/ou moteurs) caractéristiques de ces maladies, fournissant ainsi des modèles de Tauopathies reproductibles et bien caractérisés. Ce projet a pour objectif de mettre en évidence l'activité thérapeutique potentielle de produits de recherche dans un modèle de souris transgénique qui développe une tauopathie. Ces études sont une étape indispensable à la poursuite du développement de futurs médicaments.

La procédure consiste à administrer aux souris transgéniques les composés à étudier par voie systémique ; le choix de la voie étant fonction du type de composés (« petites molécules », ou « produits biologiques ») de leur bio-distribution et de la durée du traitement. Le suivi de l'effet des composés sur la pathologie se fait via des tests cliniques (moteurs et cognitifs) et des dosages biochimiques. En fin d'étude les biomarqueurs d'activité sont étudiés par des dosages dans le sang, éventuellement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et dans les organes d'intérêt. La durée de traitement est fonction du type d'effet attendu. Les traitements peuvent être administrés de façon aiguë (1 administration) ou chronique (de quelques jours à plusieurs mois).

Les produits de recherche sont tout d'abord sélectionnés via des tests biochimiques et cellulaires. Cette étape permet de retenir les produits ayant l'activité la plus intéressante sur la cible biologique, mais aussi les meilleurs facteurs prédictifs de bio-distribution et de sécurité. Puis une seconde sélection est effectuée sur des tests dit « effet-propre » des composés chez des rongeurs sains, afin de mesurer l'expression des biomarqueurs d'activité, ainsi que leur bio-distribution. Seul(s) le ou les produits présentant les meilleures performances dans ces études seront retenus pour ses études de preuve d'efficacité thérapeutique. Les modèles cellulaires permettent d'étudier certains mécanismes pathologiques mais ne permettent pas de prendre en compte la complexité et l'interaction des systèmes biologiques. L'évaluation de l'effet thérapeutique de ces nouveaux composés ne peut être complet qu'après évaluation dans des modèles *in vivo*. Les études dans un modèle transgénique de Tauopathie permettent donc de s'assurer que les effets thérapeutiques de nouveaux composés sont évalués dans un organisme entier et complexe possédant ainsi de façon intégrée tous les paramètres comportementaux, biochimiques et pathophysiologiques.

Les études préalables de bio-distribution, ainsi que les outils de modélisation mathématique permettent de déterminer les doses les plus pertinentes et le schéma de traitement le plus favorable et ainsi de réduire le nombre d'animaux en réduisant le nombre de doses testées et/ou d'études à faire. Les travaux antérieurs de caractérisation de cette lignée, ainsi que l'historique des données des études de pharmacologie ont permis, avec l'aide d'un biostatisticien, de préciser le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans une étude pour démontrer de façon scientifique et statistiquement significative, un effet des composés, en tenant compte de l'objectif et des contraintes de l'étude (nombre de groupes, type de comparaisons, présence de répétitions), de la variabilité des paramètres mesurés et de la taille des effets à mettre en évidence.. Cela contribue à réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire. De plus ce modèle *in vivo* permet une mesure simultanée de biomarqueurs cliniques mais aussi biochimiques et pour certains de façon répétée au cours du traitement. Cette approche permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la pleine caractérisation de l'effet thérapeutique. Enfin la mesure des biomarqueurs biochimiques favorise la translation à l'homme.

La manipulation des animaux, les techniques d'administration et de prélèvement sont réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires, incluant anesthésie/analgésie lorsque c'est nécessaire. Pour les traitements chroniques de longue durée, quand les caractéristiques biophysiques du produit le permettent, le produit sera incorporé dans la boisson ou la nourriture afin de réduire le nombre de manipulation des animaux. L'ensemble des interventions peut entraîner un inconfort ou un stress léger à modéré. Des phases d'habituation à la manipulation, à l'environnement et aux appareillages, un nombre limité de tests par animal, couplé à une surveillance quotidienne par du personnel compétent et formé à l'observation des signes cliniques permettent de réduire et de détecter et soulager tout

inconfort de l'animal. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec de l'enrichissement et sont en interaction quotidienne avec le personnel. Quand les tests comportementaux nécessitent un hébergement individuel, cela est réduit à la durée strictement nécessaire, et il est maintenu un contact visuel, auditif et olfactif entre congénères. La lignée transgénique utilisée est une lignée établie depuis plus de 15 ans, et l'étude de son phénotype a permis d'établir que la modification génétique bien qu'entraînant des déficits de mémoire et quelques modifications motrices, n'induisait pas d'impact même léger sur le bien-être animal comparativement aux animaux issus des mêmes colonies et ne portant pas la modification génétique. Ce projet utilisera un maximum de 1200 souris sur une période de 2 ans.

16791 Chez l'humain, le vieillissement normal ou le vieillissement pathologique tel que la maladie d'Alzheimer ou des traumatismes et lésions cérébrales, se traduisent par des pertes de mémoire irréversibles. Pour mettre au point de nouvelles thérapies, afin de pallier à ces déficits cognitifs, des modèles souris, notamment transgéniques, ont été développés. Toutefois, actuellement aucun test comportemental chez la souris n'est suffisamment sensible pour discriminer les différentes catégories de mémoires impactées par la maladie comme cela a pu être mis en évidence chez l'humain : pour ce faire nous avons développé un test original : l'Helico Maze.

Afin de réduire le nombre de souris nécessaire pour cette expérimentation, nous utiliserons un nombre maximum de 20 souris réparties en deux groupes : 10 souris sauvages (wild type) C57BL/6 et 10 souris transgénique (5xFAD) modèle de la maladie d'Alzheimer. Il n'y a pas de méthode de substitution pour ce type de modèle animal et pour ce type de test comportemental. Les procédures expérimentales n'entraînant aucune douleur, les animaux ne reçoivent pas d'analgésiques.

Pour améliorer les conditions d'élevage des souris, elles seront hébergées dans une animalerie SOPF en cage individuelle dont l'environnement sera enrichi avec des mandrins en carton. La nourriture est ad libitum mais les animaux seront légèrement privés en eau pour créer un niveau de motivation suffisant pour apprendre et mémoriser les indices olfactifs. Les souris seront manipulées quotidiennement par les expérimentateurs pour les habituer aux conditions expérimentales et seront pesées régulièrement. Elles ne seront exposées à aucune manipulation invasive ou douloureuse et ne subiront aucune anesthésie ou intervention chirurgicale.

16792 Le domaine d'expertise de notre unité de service est centré sur la caractérisation et l'étude fonctionnelle des populations du système immunitaire murin en conditions normales et inflammatoires. En tant que prestataire de services, nous réalisons ces études pour des laboratoires partenaires publics ou privés. L'effort de recherche de nos partenaires actuels est principalement tourné vers la compréhension du mode d'action de molécules impliquées dans la régulation du système immunitaire et dans la production de cytokines pro-inflammatoires dans le contexte de maladies auto-immunes ou du développement de tumeurs.

L'objectif du projet attendant à cette demande est d'étudier la réponse immunitaire adaptative après activation systémique des cellules T sous l'effet d'un traitement par l'anticorps anti-CD3E murin. Cette inflammation généralisée va induire la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules immunorégulatrices, appelées IMR. Certains de ces IMR sont d'ores et déjà utilisés comme cibles d'anticorps à visée thérapeutique dans le traitement de certains cancers tel que le cancer de la peau de type mélanome.

Comprendre le mode d'action de ces molécules et leur potentiel impact sur l'activation des lymphocytes T et sur la sécrétion de cytokines associées à cette activation, serait une avancée majeure dans l'optique de traitements thérapeutiques contre de nombreux autres cancers ou maladies inflammatoires auto-immunes.

Pour ce faire, nous utiliserons des lignées de souris génétiquement modifiées pour des IMR cibles sélectionnés par nos laboratoires partenaires. Après induction de l'inflammation par l'anticorps anti-CD3E murin, nous réaliserons la caractérisation des différentes populations du système immunitaire (également appelé Immunophénotypage) de ces lignées mutantes pour étudier l'impact de chaque IMR sélectionné. Les cohortes de souris génétiquement modifiées seront soit produites au sein de notre

animalerie de statut sanitaire SOPF, soit produites par nos laboratoires partenaires puis exportées dans notre animalerie.

Pour chaque lignée caractérisée, nous réaliserons deux expériences séparées pour chacun des génotypes : Contrôle (CTRL), mutant (MUT) hétérozygote (HET) et MUT homozygote (HOM). Dans la première expérience « Etat basal », nous testerons s'il existe un effet de la mutation lié au sexe en caractérisant 3 mâles et 3 femelles de chaque génotype (CTRL, MUT HET, MUT HOM), soit 18 souris. Dans la deuxième expérience « Etat inflammé », nous testerons l'état inflammatoire des souris après injection de l'anti-CD3 ϵ murin en caractérisant 3 souris par génotype (9 souris au total), soit de sexe mâle, soit de sexe femelle mais de même sexe entre CTRL et MUT afin de s'affranchir de potentiels effets additifs des variations (celles liées au sexe et celles liées à l'inflammation). De plus, les souris CTRL et MUT seront de même fond génétique, ce qui permettra, après inflammation, d'éliminer les variations liées au fond génétique pour ne relever que les variations liées à l'inflammation pour la mutation étudiée.

Nous réaliserons, au maximum, l'immunophénotypage de 25 lignées par an, soit un recours à 675 souris par an. Au cours des cinq années de cette demande, un maximum de 3375 animaux seront utilisés.

Les souris seront âgées de 8 à 10 semaines et devront peser au minimum 20g au début de l'expérimentation.

Le traitement par l'anticorps anti-CD3 ϵ murin peut induire de possibles altérations physiques dues à l'inflammation (sommolence, hypomotilité, hypothermie et pilo-érection) qui seront minutieusement observées et monitorées au moyen d'une grille de score. La durée de la procédure expérimentale n'excèdera jamais 48 heures.

Tout au long de la procédure expérimentale, nous mettrons en place et respecterons la règle des 3Rs. Concernant le principe de « Remplacement », dans ce modèle il n'est pas envisageable d'utiliser une méthode alternative et/ou substitutive. En effet, nous devons nous placer à l'échelle de l'organisme entier pour caractériser l'impact des IMR sur la réponse immunitaire dans un contexte inflammatoire où toutes les boucles de régulation doivent être présentes.

Concernant le principe de « Réduction », les méthodes de standardisation développées au sein de notre laboratoire nous permettent de réduire le nombre d'animaux tout en ayant des résultats statistiquement significatifs. Cette standardisation est caractérisée par l'utilisation d'automates et d'instruments de mesure calibrés ainsi que d'outils d'analyse automatisés limitant les variations liées aux manipulateurs. En se basant sur ces procédures standardisées, le bio-informaticien de notre service a ainsi déterminé un calcul de puissance nous permettant de définir le minimum de souris nécessaires pour caractériser les différentes populations d'intérêt pour chaque mutation étudiée et chacune des conditions testées (« Basal » ou « Inflammé »).

De plus, si les cohortes générées par les laboratoires partenaires le permettent, jusqu'à deux lignées de souris génétiquement modifiées pourront être traitées avec un même groupe de souris contrôle, réduisant ainsi le nombre de souris utilisées par expérimentation.

Enfin, pour ce qui est du principe de « Raffinement », les souris seront hébergées par groupe de 5 au maximum et les cages seront systématiquement enrichies par l'ajout de plusieurs éléments :

- une maison en carton ou « Safe Hut », (Safe) pour leur procurer un abri,
- un bâtonnet de papier ou « Enrichment Diamond Twists » (Envigo), que les souris pourront grignoter afin de se confectionner un nid,
- l'aliment et l'eau seront distribués ad libitum, complétés par de la nourriture hydratée ou « Gel Diet » (Safe) pour pallier toute perte de poids durant la procédure expérimentale,
- des carrés de cotons qui leur fourniront de la chaleur afin de prévenir une éventuelle hypothermie.

Un temps d'adaptation d'une semaine sera également respecté entre la réception des animaux et le début du protocole expérimental. Les souris seront observées quotidiennement par le personnel de zootechnie formé et qualifié et des points limites seront préalablement établis. L'utilisation de la grille

de score permettra de définir les actions à mettre en œuvre aux premiers signes de souffrance chez les souris traitées.

16793 Les tumeurs primaires osseuses sont le plus souvent des tumeurs pédiatriques. Malgré les progrès de la chirurgie et des chimiothérapies, le taux de survie reste autour de 70% quand la tumeur est locale mais tombe à moins de 30% chez les très nombreux patients développant des métastases. Récemment, nous avons mis en évidence le rôle pro-tumorigénique d'une protéine exprimée dans certaines cellules cancéreuses. L'objectif de notre travail est d'étudier le rôle de cet oncogène dans l'établissement de la maladie résiduelle, la mise en dormance des cellules tumorales et les mécanismes de réactivation des tumeurs qui conduisent aux récurrences et ainsi déterminer s'il peut constituer une nouvelle cible thérapeutique pour empêcher la survenue des métastases ou pour traiter les métastases existantes au diagnostic. Notre modèle de tumeur osseuse métastasée consiste à injecter des cellules tumorales directement dans un os long et/ou dans la circulation. Selon la quantité de cellules injectées nous pouvons soit obtenir un développement tumoral rapide en 4-6 semaines, soit induire une maladie résiduelle qui reste asymptomatique pendant plusieurs mois comme chez les patients. Les mesures suivantes seront prises pour respecter la règle des 3R : Les procédures d'injection intra-osseuse seront réalisées sous anesthésie et analgésie. Les animaux seront suivis quotidiennement les 3 jours suivant l'injection, puis 3 fois par semaine. Tout signe de souffrance entraînera l'injection d'analgésique puis la mise à mort si l'état ne s'améliore pas. Des points limite seront établis à l'avance. Nous avons acquis une grande expérience du modèle de tumeurs osseuses chez la souris. Le geste d'injection est bien maîtrisé et n'entraîne pas de lésion invalidante. Les animaux seront mis à mort avant que la tumeur qui se développe n'entraîne par elle-même une altération des conditions de vie des animaux (difficultés à se déplacer ou à atteindre la nourriture). Nos hypothèses sont basées sur de nombreux travaux préalables *in vitro* dans des cultures cellulaires. Nous avons optimisé les analyses effectuées *ex-vivo* pour utiliser le minimum d'animaux. Le programme s'effectuera étape par étape, avec des évaluations constantes. Le nombre d'animaux sera adapté en conséquence. Nous pensons utiliser au maximum 660 souris sur 5 ans pour l'ensemble de ce programme.

16794 La cochlée est un organe de l'oreille interne en forme d'escargot et qui assure la dernière étape de l'intégration du son avant le nerf auditif. L'implant cochléaire est le seul dispositif médical qui permet de stimuler un organe sensoriel ayant perdu sa fonction. L'utilisation d'implant cochléaire est désormais courante, notamment chez des patients qui présentent une surdité profonde. Il est possible de réaliser une implantation sans traumatisme chez les patients ayant une audition résiduelle sur certaines fréquences sonores. Il est donc possible de réaliser une stimulation auditive sonore (via les voies auditives naturelles), électrique (via l'implant) ou bimodale électro-acoustique. Le mode d'activation des aires corticales auditives sous cette dernière modalité est inconnu à ce jour, ce qui limite les possibilités de réhabilitations des personnes sourdes.

Cette étude sera divisée en 2 étapes : Étape 1, validation de l'approche IRMf (imagerie par résonance magnétique fonctionnelle) pour explorer les réponses cérébrales à une stimulation auditive chez le porc juvénile ; Étape 2, validation de l'approche IRMf chez le porc juvénile implanté avec audition résiduelle et étude de la stimulation bimodale électro-acoustique.

L'étape 1 sera réalisée sur 10 porcs juvéniles. Les animaux seront soumis à une évaluation objective de leur audition. Ils passeront initialement une IRM anatomique de référence puis une IRMf sous stimulation auditive à différentes fréquences.

L'étape 2 sera réalisée sur 20 porcs juvéniles. Les animaux seront soumis à une évaluation objective de leur audition via l'enregistrement de potentiels évoqués acoustiques (PEA = réponse électrophysiologique spontanée des voies nerveuses auditives) ainsi qu'à une IRM anatomique de référence. Il sera ensuite réalisé une chirurgie d'implantation cochléaire guidée par scanographie (CT-Scan), avec deux bras : bras 1 (implant cochléaire, n=10) et bras 2 (témoin/procédure contrôle, appelée sham, n=10). Après chirurgie, réalisation d'une IRM anatomique et fonctionnelle en conditions de stimulation auditive sonore, acoustique ou électro-acoustique (modalité EAS) pour exploration des réponses cérébrales.

Toutes ces procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Un protocole d'anesthésie à l'isoflurane sera entrepris pour les PEA et les IRM. Une anesthésie de niveau chirurgical sous monitoring et à l'isoflurane sera réalisée en amont de la procédure chirurgicale d'implantation cochléaire. L'analgésie per et post-opératoire sera réalisée avec du chlorhydrate de morphine et un traitement antibiotique prophylactique sera appliqué.

REDUIRE : Les effectifs animaux utilisés (N=10 par traitement, soit 30 animaux au total) pour cette étude correspondent à un effectif raisonnable pour bénéficier d'une puissance statistique appropriée aux mesures réalisées. **RAFFINER** : Les approches d'imagerie et de chirurgie ont été choisies et optimisées de manière à être le moins invasif possible (i.e. imagerie *in vivo* sur animaux anesthésiés, anesthésie chirurgicale guidée par scanographie et analgésie pré- et post-opératoire pour le protocole d'implantation chirurgicale). **REMPLETER** : le modèle de porc juvénile est un modèle animal ayant déjà fait ses preuves pour l'étude des activations cérébrales, notamment dans le domaine de l'olfaction. Une précédente étude sur un modèle murin n'avait pas permis de mettre en évidence de différences d'activation cérébrale en raison d'une résolution spatiale non satisfaisante, contrairement au modèle de porc juvénile. La procédure n'est pas réalisable chez l'Homme en raison de la présence d'un cône d'ombre important gênant l'interprétation des IRM, du fait de la présence de l'implant.

16795 L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité thérapeutique de composés chimiques ou biologiques dans un modèle reproduisant une pathologie humaine de fibrose pulmonaire.

La fibrose est la conséquence de l'activation chronique des fibroblastes et myofibroblastes, cellules situées dans le tissu conjonctif de différents organes, qui se mettent à produire en permanence du tissu cicatriciel (dépôts de collagène, élastine, fibronectine).

Dans les poumons, l'apparition de ce tissu cicatriciel s'accompagne ou est précédée d'une phase inflammatoire. La fibrose pulmonaire se caractérise par une perte de l'élasticité du poumon et l'apparition d'une insuffisance respiratoire chronique chez le patient (toux, essoufflement, fatigue, cyanose...). Il n'existe pas à ce jour un médicament permettant d'éliminer la fibrose pulmonaire, les traitements disponibles ralentissent uniquement la progression de la maladie sans réduire les signes cliniques comme la toux, l'essoufflement et l'insuffisance respiratoire.

Les études *in vitro* sur des coupes de poumons fibrosés ne permettent pas, à ce jour, de prévoir l'efficacité *in vivo* de potentiels candidats-médicaments, car les étapes de remodelage du tissu pulmonaire ne peuvent pas être étudiées dans un système statique. Il n'y a donc pas de remplacement possible des études *in vivo* prévues dans ce projet par des études *in vitro*.

La bléomycine (agent anti-cancéreux utilisé chez l'homme) est connue pour se concentrer dans les poumons, avec comme effet secondaire délétère le développement chez le patient d'une fibrose pulmonaire. Chez le rongeur, lorsqu'elle est instillée par voie intratrachéale sous anesthésie générale, ou par voie sous-cutanée via une mini-pompe, la bléomycine induit une fibrose pulmonaire semblable à celle observée chez l'homme. L'administration de Bléomycine déclenche l'apparition d'une fibrose atteignant son maximum entre 3 et 4 semaines, pour se résoudre ensuite spontanément 6 à 8 semaines après l'exposition. Les signes cliniques attendus chez les animaux sont : une perte de poids transitoire consécutive à l'inflammation pulmonaire après l'administration de la Bléomycine, et une possible réduction de l'activité lorsque la capacité respiratoire est altérée par la fibrose. Lorsque l'un de ces deux signes cliniques apparaît, une nourriture gélatinisée est mise à disposition sur la litière au fond de la cage pour faciliter l'hydratation et la consommation alimentaire des animaux. Une réhydratation par injection de Ringer Lactate aide aussi les animaux à limiter leur perte de poids et à surmonter la phase d'inflammation.

La fibrose pulmonaire peut aussi être induite consécutivement à une radiothérapie anti-cancéreuse du poumon. C'est un effet secondaire sévère connu chez le patient car les rayons entraînent une destruction des tissus cancéreux mais aussi des tissus sains, avec une très forte inflammation et une cicatrisation anarchique. Le développement de la fibrose pulmonaire induit par la radiation est plus lent à se mettre en place, et dépend de la dose et de la fréquence des rayons.

Ce projet reproduira chez le rongeur la pathologie pulmonaire fibrotique telle qu'elle est observée chez l'homme, et permettra l'évaluation de composés anti-fibrotiques. L'efficacité des composés testés sera

déterminée par la mesure de marqueurs circulants et pulmonaires (TGF β , dépôts de collagène, hydroxyproline...). Les composés chimiques ou biologiques qui seront évalués dans ce projet auront au préalable été sélectionnés sur des critères de puissance et d'efficacité *in vitro*. En fonction de leurs propriétés pharmacocinétiques, ils pourront être testés en mode préventif ou thérapeutique par exemple par voie orale, intrapéritonéale ou sous-cutanée.

Une analyse statistique des résultats obtenus lors de l'étude pilote nous permettra de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire par groupe dans les études pour obtenir un effet significatif de 50% sur les marqueurs pertinents (poids des poumons, taux d'hydroxyproline, dépôts de collagène)

Pour une période de 5 ans, on peut estimer une utilisation de 500 rongeurs/an soit au maximum 2500 animaux au total pour ce projet.

16796 Ces travaux pratiques sont destinés à des étudiants de master 1 recherche en Neurosciences, ils proposent d'approfondir les notions d'expérimentation en neuropharmacologie. Cette formation, indispensable pour la poursuite de leurs études, leur permettra d'appréhender des paramètres tels que le comportement spontané de la souris, la variabilité intrinsèque des performances comportementales, l'interprétation croisée de données d'observation et l'analyse statistique.

L'effet de substances pharmacologiques sera étudié sur différents comportements de la souris grâce à 3 tests comportementaux d'exploration communément utilisés en recherche sur l'état d'anxiété et n'engendrant aucun stress majeur pour l'animal : la planche à trous (comportement exploratoire), l'enfouissement de billes (comportement de type compulsif), et l'open field (activité locomotrice). Ces travaux pratiques (TP) dureront 4 heures et seront organisés de la manière suivante :

- brève introduction par les responsables du TP
- introduction sur l'expérimentation animale de 15 min par un responsable de l'animalerie
- tests comportementaux conduits en aveugle
- analyse des résultats.

L'effectif sera de 24 étudiants, répartis en 9 groupes (binômes ou trinômes). Chaque groupe d'étudiant aura en charge des souris ayant auparavant reçu une administration de sérum physiologique, ou d'anxiolytique (valium), ou d'anxiogénique (psychostimulant). Chaque groupe observera, durant la conduction successive des trois tests, des comportements différents. A la fin des diverses observations, les résultats de l'ensemble des groupes d'étudiants seront assemblés afin de conduire des analyses statistiques. Cette analyse permettra aux étudiants d'interpréter correctement les résultats de leurs tests afin de déterminer la substance administrée à chacun des groupes de souris.

Un nombre total de 216 souris sera utilisé pour une durée de 5 ans. La procédure expérimentale a été élaborée afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Dans la nécessité d'une prise en main pratique de la manipulation à visée d'observation fine du comportement, ces études ne peuvent s'effectuer que sur l'animal. Les modèles expérimentaux qui seront utilisés sont très reproductibles et ne comportent aucune forme de risque particulière, ce qui réduit le nombre d'animaux nécessaires. Le seul point qui pourrait impacter le bien être des animaux est comme dans toute animalerie expérimentale, des relations agressives entre congénères mâles d'une même cage. Pour cela, toute souris démontrant d'une agressivité telle qu'elle blesse ses congénères, ou présentant une perte de poids supérieure à 10% entrainera la l'euthanasie anticipée de l'animal avant le début des procédures. Cette agressivité entre congénères, remarquée dans des cas exceptionnels, sera réduite en optimisant l'angoisse des animaux. Cette dernière sera minimisée par au moins une semaine d'habituation aux conditions d'hébergement avant la conduction des travaux pratiques, et l'ajout de nids végétaux aux conditions d'hébergement. A la fin de la procédure, toutes les souris seront euthanasiées.

16797 La surveillance de l'exposition humaine aux polluants environnementaux est aujourd'hui une préoccupation majeure en santé publique. Parmi les contaminants environnementaux, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent une famille de composés organiques les

plus fortement représentés. Les HAP comprennent une centaine de substances, parmi lesquelles le chef de file est le benzo(a)pyrène (B(a)P).

Les HAP constituent une classe de composés organiques issus de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de matière organique et/ou de différents processus industriels. Les pollutions aux HAP constituent des mélanges complexes d'une centaine de composés. Les voies d'exposition humaine sont multiples mais les aliments représentent la principale source d'exposition chez les non-fumeurs (produits céréaliers, produits de la mer). Des études épidémiologiques soulignent un lien entre l'exposition aux HAP et certaines maladies métaboliques comme le diabète et certains cancers (poumons, vessie, peau). Du fait du potentiel toxique et cancérigène des HAP, la surveillance de l'exposition humaine aux HAP est aujourd'hui une préoccupation majeure en santé publique. Actuellement, différents biomarqueurs sont proposés pour évaluer l'exposition humaine aux HAP.

Le but de notre étude est de comprendre les relations entre une exposition à de faible dose d'un mélange complexe de HAP et la modification de certains paramètres biologiques sanguin et urinaires dans le but d'identifier des biomarqueurs d'expositions et d'effets spécifiques.

L'originalité de l'étude consistera à utiliser un mélange de HAP prélevé directement sur un site industriel contaminé. Ce mélange contient des produits dérivant de la houille utilisés dans les électrodes des fours de métallurgie. Il est bien caractérisé quant à sa composition en HAP mais contient également d'autres types de polluants que nous ne pourrions pas caractériser de façon exhaustive. De ce fait, ce mélange sera comparé (1) à un mélange synthétique dont la composition en HAP sera identique (qualitativement et quantitativement) au mélange réel prélevé sur site ainsi que (2) au BaP seul à une dose identique aux 2 mélanges précédents et au pyrène seul. Cette approche nous permettra de voir si la complexité du mélange potentialise ou pas les potentiels effets métaboliques observés avec le BaP. Elle permettra également de déterminer la spécificité des modifications observées avec le BaP en le comparant avec le pyrène.

L'étude des effets cocktails est une problématique majeure de la toxicologie contemporaine et ce projet permettra d'apporter des éléments sur la méthodologie à mettre en place pour répondre à cette question complexe.

Le rat a été choisi comme modèle étant donné la littérature abondante disponible sur cette espèce, sa proximité physiologique avec l'Homme et la publication des résultats antérieurs sur cette thématique scientifique. De plus, le rat est classiquement utilisé dans les études de toxicologie.

Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre à cette question est de 210 rats.

Dans un premier temps, une étude préliminaire sur 60 rats permettra de déterminer (1) la dose de BaP à sélectionner dans l'étude finale (= étude effet-dose) et (2) le temps optimal après la dernière exposition pour identifier et mesurer les biomarqueurs d'intérêt. L'étude finale portera sur 150 rats. Dans cette partie, les rats seront exposés soit BaP seul, soit au mélange synthétique, soit au mélange réel. Les quantités administrées des mélanges seront ajustées pour avoir une dose d'exposition identique au BaP, la dose de BaP étant déterminée à partir des résultats de l'expérience préliminaire. Le groupe témoin sera exposé à de l'huile de maïs. Les urines, le sang et les organes seront récoltés pour les analyses biochimiques et métaboliques.

L'étude sera réalisée dans le respect des 3 R.

Remplacement : L'impact de mélanges complexes de HAP ne peut pas être évalué uniquement *in vitro* d'une part à cause de l'importance de la prise en compte de la toxicocinétique des polluants (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination) et d'autre part du fait de la complexité des voies métaboliques et biochimiques qui font appel à plusieurs organes.

Raffinement : Les rats seront nourris avec un régime standard et seront traités selon les règles éthiques de l'expérimentation animale. L'ensemble du projet est mené par un personnel compétent en expérimentation animale qui maîtrise parfaitement les gestes techniques nécessaires. L'euthanasie sera réalisée sans souffrance par intoxication au CO₂ et confirmée par exsanguination. Il existe également une surveillance quotidienne des animaux avec des critères stricts. Au-delà du non-respect d'un certain nombre de ces critères, ils seront considérés en souffrance et euthanasiés. De plus, une acclimatation de 24 heures sera réalisée dans les cages métaboliques avant chaque prélèvement

urinaire. Le milieu sera enrichi afin de pallier à l'isolement des individus. Réduction : Le nombre de rats pour chaque étape a été évalué pour obtenir des résultats statistiquement exploitables.

16798 Le présent projet s'inscrit dans le cadre du développement d'un candidat-médicament et a deux objectifs principaux. Premièrement, nous souhaitons déterminer le profil PK/PD (Pharmacocinétique/Pharmacodynamie) de ce candidat-médicament dans le but d'élaborer une stratégie de choix de dose en clinique. Cette étude vient en complément de précédents résultats d'efficacité (PD) chez la souris nous ayant permis d'associer plusieurs doses avec un effet thérapeutique sur la fuite capillaire et la survie dans un modèle de choc septique induit par administration de Lipopolysaccharide (LPS). Nous souhaitons obtenir le profil pharmacocinétique de ces différentes doses dans le même modèle, afin d'établir le lien entre dose, concentration sanguine et effet thérapeutique du produit, ce qui est demandé par les instances réglementaires. Nous devons donc réaliser les études PK dans les mêmes conditions que l'étude PD déjà réalisée. Deuxièmement, nous souhaitons mesurer la demi-vie de la forme soluble du récepteur de la voie ciblée par notre candidat-médicament, dans le but d'anticiper sur une interférence possible de cette protéine sur le profil PK/PD du candidat-médicament. Ceci nous permettra également de mieux caractériser le turnover de son expression.

Ce projet est divisé en deux parties expérimentales:

La première vise à administrer le candidat-médicament à différentes doses par voie intrapéritonéale chez des souris septiques, 1 heure après injection de LPS, conformément au design de l'étude PD citée ci-dessus.

La deuxième partie consiste à injecter une dose unique d'une forme recombinante (humaine ou murine) de la forme soluble du récepteur d'intérêt, par voie rétro-orbitale, chez des souris contrôles ou septiques et déficientes en récepteur d'intérêt (Knockout), 3 heures après injection de NaCl ou de LPS respectivement. Ce timing correspond au début de la cinétique d'apparition de la protéine endogène chez des animaux wild-type septiques et permet d'étudier la demi-vie de la protéine dans un contexte inflammatoire établi. Nous souhaitons travailler avec les deux protéines en parallèle, car elles diffèrent de plus de 50% en termes de séquence, ce qui peut affecter les mécanismes endogènes de dégradation et d'élimination et donc leur demi-vie.

Dans les deux parties de l'étude, des prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie et par voie rétro-orbitale aux différents temps de cinétique définis, la cinétique la plus longue étant de 180 minutes. Les résultats permettront de déterminer les concentrations plasmatiques au cours du temps ainsi que les paramètres pharmacocinétiques tels que la demi-vie et la clairance.

Règles éthiques des 3R:

Remplacement: En considérant l'impact des désordres hémodynamiques et métaboliques survenant au cours du sepsis et pouvant impacter les profils pharmacocinétiques, ce type d'étude ne peut pas être réalisée in-vitro faute de l'existence de modèles appropriés.

Réduction: Une étude préalable de pharmacocinétique sur des souris saines a permis d'ajuster les temps de prélèvements sanguins ainsi que le calcul du n. Le nombre de 3 souris par groupe et par temps a été jugé suffisant pour apprécier une différence dans la comparaison des profils PK de chaque dose administrée. Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle mathématique pour modéliser la PK permet de limiter l'étude à 3 doses et d'extrapoler ensuite les résultats à 4 autres doses. Ainsi nous réduisons significativement le nombre d'animaux. Le nombre total d'animaux est de 99 souris wild-type et 144 souris knockout.

Nous prévoyons de limiter le nombre de prélèvements sanguins à un par souris. En effet, le sang issu de souris septiques est plus susceptible de coaguler dans le tube et de former des caillots, sa viscosité peut varier d'une souris à l'autre selon les facteurs de la coagulation activés et le niveau d'hématocrite. Ceci ne peut être ni anticipé ni calibré, nous estimons par expérience qu'un volume de 250µL de prélèvement est requis pour obtenir au moins 100µL de plasma pour toutes les souris. 250µL représente environ 13% du volume sanguin total d'une souris (volémie de 79mL/kg, soit 1.9mL pour une souris de 25g), Par ailleurs, ce modèle est associé à des altérations des paramètres

hémodynamiques. Nous considérons donc qu'il n'est pas recommandé de procéder à un deuxième prélèvement dans une période de temps courte (Diehl.KH et al, J. Appl.2001).

Raffinement: Les animaux seront hébergés à maximum 5 animaux dans des cages de 500cm² et avec un enrichissement à base de tunnels en cartons. L'injection du candidat-médicament, des formes recombinantes du récepteur d'intérêt et tous les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie et par un personnel qualifié. Pour les temps longs, les animaux seront anesthésiés 5 minutes avant de réaliser les injections et prélèvements avec un réveil de l'animal entre les deux procédures. En revanche, dans le cas des injections du candidat-médicament ou des formes recombinantes du récepteur d'intérêt où moins de 5 minutes séparent l'injection d'un prélèvement (temps courts), les animaux resteront anesthésiés. Les animaux seront observés tout au long de l'expérimentation et en cas d'atteinte d'un des points limites fixés (dos rond ou animal immobile), les animaux seront mis à mort dans des conditions éthiques.

Bien que le modèle de choc septique induit par une dose de LPS de 8mg/kg entraîne une réponse inflammatoire exacerbée et des dysfonctions d'organes avec un taux de mortalité de 40-50%, l'apparition des premiers signes de souffrance de l'animal ne surviennent qu'à partir de 4 heures après injection de LPS. Les défaillances d'organe et la mortalité sont des signes beaucoup plus tardifs et survenant 48 heures après l'injection de LPS. Or, les expériences dureront 4 heures maximum pour la partie 1 et 6 heures maximum pour la partie 2. Pour cette raison, les animaux de la deuxième partie de l'étude recevront une dose de buprénorphine (0.1mg/kg) juste après injection de LPS. A la fin de l'expérimentation, l'ensemble des animaux sera mis à mort par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse par un personnel expérimenté.

16799 La myéline est une gaine essentielle à la fois pour l'isolation et la protection de chaque nerf du cerveau et de la moelle épinière et à la conduite normale du message nerveux. La réparation de la myéline est devenue le principal objectif thérapeutique dans les maladies démyélinisantes telles que la sclérose en plaques (SEP). Cette maladie, pour laquelle il n'existe pas encore de traitement curatif, touche 100 000 personnes en France, dont 75 % des personnes atteintes sont des femmes et 4 000 à 6 000 cas se déclarent en France chaque année. Récemment, nous avons montré que le traitement avec une dose physiologique de l'hormone testostérone via son récepteur cellulaire (AR) stimule efficacement la reformation de la myéline dans deux modèles expérimentaux de dégradation de la myéline chez la souris. Le traitement par la testostérone favorise la réparation de la myéline dégradée (remyélinisation) en stimulant le recrutement des oligodendrocytes (cellules du système nerveux dont le rôle est de synthétiser la myéline). Fait important, nos études de biologie moléculaire nous ont permis de cibler de nombreux gènes, impliqués dans ce processus de réparation de la myéline, dont principalement le récepteur de chimiokines CXCR4. La suite de ce travail sera d'étudier *in vitro* et chez la souris comment la testostérone module le gène CXCR4 pour promouvoir le recrutement des oligodendrocytes et par conséquent la réparation de la myéline. Pour cela, en plus des cultures cellulaires *in vitro*, nous utiliserons un modèle expérimental approprié pour induire une dégradation de la myéline chez la souris, à savoir une démyélinisation focale et aiguë par l'injection de la toxine (lysophosphatidylcholine : LPC) dans la moelle épinière de la souris.

In vitro : les études de biologie moléculaire et les différentes étapes impliquées dans le processus de remyélinisation (migration et prolifération des oligodendrocytes ainsi que leur synthèse de nouvelle myéline) seront effectuées. En plus, cette partie de l'étude nous permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. *In vivo*, nous utiliserons des souris mâles et femelles, puisque cette maladie touche 3 fois plus de femmes que d'hommes. Aussi, des souris sauvages (C57BL/6) et des souris transgéniques (souris ARNestine/Cre/LoxP), chez lesquelles le récepteur de la testostérone (AR) est inactivé sélectivement dans leurs cerveaux et moelles épinières, par la technique de biologie moléculaire (nestine/cre/loxp), seront utilisées. La règle de 3 R (réduire, raffiner et remplacer) sera appliquée le long de ce programme de recherche. Le nombre d'animaux, calculé par la puissance statistique, sera réduit à 8 par point expérimental, le minimum requis de façon à mettre en évidence des différences statistiques avec un risque d'erreur inférieur à 5%. Nous utiliserons au maximum 508 souris en 5 ans. La méthodologie expérimentale est optimisée pour utiliser le strict nécessaire d'animaux, appartenant à la même lignée. Malgré une analyse de l'effet faisant l'objet de cette demande

dans des cultures cellulaires, ces dernières ne peuvent pas remplacer l'analyse de l'effet chez l'animal puisque le processus de myélinisation met en jeu des interactions complexes entre tous les types cellulaires présents dans la moelle épinière, et que toutes ces interactions ne peuvent pas être reflétées dans des cultures. Quant au raffinement, nos animaux seront hébergés par groupe de 5 animaux par cage dans des conditions optimales d'hébergement (nourriture et eau disponible à volonté, présence de lambeaux fins de papier pour faire un nid, ...). Une surveillance journalière très étroite sera assurée après la chirurgie. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale et des antalgiques sont prévues en postopératoire. Au moment de l'expérimentation et pendant la phase de réveil à l'issue de la chirurgie, les animaux seront maintenus dans un climat chauffé (tapis chauffant, 29°C) pour éviter l'hypothermie. Le but de ce projet est d'identifier *in vitro* et *in vivo* le rôle du gène CXCR4 dans l'effet remyélinisant du couple Testostérone/AR, effet important dans la thérapie de la sclérose en plaques.

16800 Le rôle de la flore microbienne naturelle dans la protection contre l'infection, qui peut impliquer un effet probiotique, est reconnu mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restent peu caractérisés. Pour étudier ce phénomène, l'utilisation de différents modèles *in vivo* chez des mammifères (souris) présentent des limites pratiques liées à leur relative complexité. Plusieurs modèles alternatifs ont ainsi émergé pour étudier les interactions hôte-pathogène dont le poisson-zèbre (*Danio rerio*). En effet, la larve du poisson-zèbre constitue un modèle de choix pour étudier ce phénomène, la flore y étant moins complexe et l'observation microscopique aisée. Il a été montré que des larves de poisson-zèbre axéniques présentent une forte sensibilité à l'infection par certaines bactéries pathogènes comparées aux larves conventionnelles, qui elles survivent, impliquant ainsi un effet probiotique de la flore naturelle.

Notre projet a pour objectif d'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-flore, 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 de mettre en lumière des bactéries probiotiques capables de protéger les poissons-zèbre 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. Enfin, l'étude du rôle protecteur de ces potentiels probiotiques contre des pathogènes de poissons pourrait être envisagée chez des poissons économiquement importants en aquaculture tels que la truite.

Ce projet requiert l'emploi de 50256 larves sur 5 ans.

Deux procédures sont présentées retraçant la stérilisation des œufs, le maintien en conditions stériles, la reconditionnalisation (avec un consortium bactérien ou des bactéries seules) des larves à 4 jours post-fertilisation (jpf) puis l'infection par une bactérie pathogène (et des mutants de celle-ci) à 6 jpf de larves dépourvues de flore (axéniques), de larves recolonisées avec une flore contrôlée (gnotobiotiques) ou conventionnelles, c'est-à-dire présentant une flore naturelle. Chacune des procédures ne diffère que par le pathogène utilisé et le protocole d'infection correspondant (dose et temps d'exposition) et elles sont toutes deux de classe sévère puisqu'elles entraînent la mort des larves infectées qui n'auraient pas été préalablement recolonisées par une flore protectrice.

Néanmoins, ce projet a été développé en prenant en compte la règle des 3R, utilisant le poisson zèbre à un stade de développement larvaire et des effectifs définis à l'aide de biostatisticiens pour permettre de tester statistiquement nos hypothèses et assurer la répétabilité des expériences. Dans le cadre du raffinement, un suivi quotidien des poissons sera réalisé et les poissons ne seront pas conservés plus de 15 jours post-fertilisation pour limiter la durée de leur inconfort au vu de notre procédure d'élevage. Nos expériences consistent à évaluer soit la protection conférée par la flore contre le pathogène soit la capacité des pathogènes sélectionnés à infecter et tuer les larves. Le niveau d'appétit ou la taille exacte des larves ne peuvent pas être mesurés dans notre système et à ce stade de développement, et l'absence de réponse au stimulus souvent synonyme de souffrance n'est pas observée de manière systématique avant la mort de l'animal. Néanmoins, les anomalies de développement et/ou morphologie ainsi que l'observation de symptômes propres à chaque pathogène mentionné seront

recherchés quotidiennement et conduiront à la mise à mort du poisson-zèbre, leur évitant une souffrance inutile sans toutefois interférer avec nos résultats.

16801 La croissance somatique dans les premières semaines de vie de l'individu dépend de l'environnement périnatal nutritionnel.

La production de glucose par l'intestin est une fonction bénéfique pour l'équilibre glycémique, qui, via un relais nerveux entre l'intestin et le cerveau, contrôle les fonctions de l'hypothalamus.

En période périnatale, la production intestinale de glucose connaît une forte induction la deuxième semaine de vie dans une fenêtre temporelle cruciale pour la mise en place des mécanismes qui contrôlent la croissance.

L'objectif de ce projet est d'apporter la preuve que la néoglucogenèse intestinale en période périnatale participe à la croissance somatique de l'individu.

Ces études seront réalisées chez la souris dont la production de glucose par l'intestin sera invalidée juste après la naissance. Une étude préalable a montré que l'absence de production intestinale de glucose dès la naissance induit une moindre prise de poids des animaux à partir la puberté (les animaux pèsent 15% de moins que leurs contrôles à l'âge adulte). Aucune autre modification qui pourrait diminuer le bien-être animal n'a été constatée.

Dans ce projet, la croissance des individus sera étudiée entre 4 et 70 jours. Le prélèvement de sang et des tissus permettra d'étudier les mécanismes qui permettent la communication entre l'intestin et le cerveau, et, dans les différentes parties du cerveau, les mécanismes qui contrôlent la croissance.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R:

Remplacement : La production intestinale de glucose contrôle l'hypothalamus via un relais nerveux de l'axe intestin-cerveau. La détection, la transmission et l'intégration de ce signal périphérique sont réalisées par les connections nerveuses entre l'intestin et le cerveau. Ce projet nécessite de conserver ces communications inter-organes et sera donc réalisé *in vivo* dans des modèles de souris transgéniques.

Raffinement : Toutes les mesures seront prises pour préserver le bien-être de l'animal. La stratégie de reproduction a été adaptée pour fournir au sein d'une même étude un nombre statistiquement suffisant d'animaux exposés à un environnement maternel homogène. La procédure de fixation des cerveaux sera réalisée sous anesthésie avec un prétraitement analgésique, sans réveil des animaux. Des signes de maladie, de perte de poids, de souffrance, de lésions ou de détérioration de l'état de santé général constituent des points limites où les souris sont mises à mort.

Réduction: Une étude précédente a permis de déterminer les limites expérimentales de ce projet, notamment la nécessité d'avoir un groupe contrôle à chaque étude. Ainsi, le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation, avec un maximum de 640 souris sur une période de 4 ans.

Ces résultats permettront de démontrer l'importance de la production intestinale de glucose en tant que fonction essentielle à la transmission de l'état nutritionnel au niveau du cerveau, et permettront d'ouvrir les possibilités bénéfiques de cette fonction à l'amélioration de l'environnement maternel.

16802 Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est un cancer cutané rare survenant principalement chez le sujet âgé de plus de 65 ans et le patient immunodéprimé (hémopathie, greffe d'organe, infection par le VIH). Son incidence, estimée à 1/100000 par an, est en constante augmentation. Il s'agit d'un cancer agressif avec 27% de malades porteurs de métastases ganglionnaires et 7% de métastases viscérales au moment du diagnostic. La survie à 5 ans est estimée à 40%. Au stade métastatique, le traitement actuellement recommandé est une chimiothérapie présentant de nombreux effets secondaires et montrant une efficacité limitée d'où la nécessité de développer de nouvelles thérapies.

L'objectif de ce travail est de développer une biothérapie permettant de cibler spécifiquement les CCM afin d'améliorer l'efficacité et la tolérance du traitement.

Dans ce but, une étude préliminaire a été menée au sein du laboratoire afin de déterminer des cibles antigéniques potentielles qui devaient :

- être accessibles *in vivo* (protéine membranaire avec épitope extracellulaire)
- être fortement exprimées par une majorité de CCM
- être spécifiques de ce cancer.

Le CD56 est une protéine transmembranaire qui constitue une cible relativement spécifique des carcinomes de Merkel.

L'utilisation d'anticorps couplés à une drogue et dirigés contre le CD56 (CD56-ADC) a déjà été proposée dans plusieurs cancers exprimant cette cible notamment le carcinome à petites cellules du poumon. Récemment, une équipe américaine a montré l'efficacité thérapeutique d'un anticorps anti CD56 couplé à une molécule cytotoxique dans un modèle de neuroblastome. L'objectif est d'évaluer l'efficacité de ce CD56-ADC dans le cadre du CCM. Pour cela, les 30 souris recevront par injection sous-cutanée des cellules tumorales humaines. 20 souris recevront des injections du CD56-ADC (2 lots de 10 recevant des doses différentes de CD56-ADC), par voie intrapéritonéale, trois fois par semaine et les dix autres serviront de témoin et recevront des injections intrapéritonéales de PBS selon le même régime.

La mise à mort des souris sera pratiquée huit semaines après injection des cellules tumorales ou en cas de développement de tumeur d'un diamètre supérieur à 0.5 cm ou d'apparition d'ulcération. La règle des trois a été respectée comme suit :

Réduction : Afin de réduire le nombre de souris, une seule dose d'anti-CD56 sera testée au regard des expériences *in vitro*, permettant d'évaluer une dose efficace et également de la littérature dans d'autres types de cancer.

Raffinement : Les souris seront dans des cages enrichies avec des maisonnettes en plexiglas et du papier absorbant. Du fait du statut immunodéficient des souris, l'ensemble du matériel d'enrichissement sera stérilisé. Les souris reçoivent une anesthésie gazeuse au moment de l'implantation des cellules tumorales.

Remplacement : Afin d'étudier le potentiel impact d'un anti-CD56 sur la croissance tumorale, le passage à un modèle *in vivo* est nécessaire.

16803 *Acinetobacter baumannii* (Ab), est un pathogène opportuniste occasionnellement responsable d'infections contractées dans les établissements de santé (infections nosocomiales). Les infections les plus rencontrées sont les infections pulmonaires en particulier chez les patients intubés et ventilés en réanimation (soins intensifs, grand brûlés...), les septicémies, les infections de plaies et les infections du tractus urinaire. Sa transmission s'effectue le plus souvent de façon manuportée par l'intermédiaire du personnel soignant ou par aérosol par le biais de matériels contaminés (ex. humidificateur, matériel de ventilation).

Ces bactéries sont devenues résistantes à un grand nombre d'antibiotiques, y compris ceux disponibles pour traiter les bactéries multirésistantes. Ainsi, la diminution de la sensibilité de *A. baumannii* aux carbapénèmes, considérés parmi les agents majeurs pour traiter les infections par *A. baumannii*, a poussé l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à inclure *A. baumannii* résistante aux carbapénèmes dans une première liste « d'agents pathogènes prioritaires ». Ce groupe critique comporte des bactéries multirésistantes qui représentent une menace particulière dans les hôpitaux, les maisons de retraite ou pour les patients dont les soins imposent d'utiliser des dispositifs comme des respirateurs ou des cathéters sanguins.

Cette alarme de l'OMS est dans le but d'alerter les pouvoirs publics, les chercheurs et les industries pharmaceutiques afin d'orienter et promouvoir la Recherche-et-Développement de nouveaux antibiotiques.

L'objectif de cette étude est de caractériser dans des modèles précliniques murins (souris femelles âgées de 8 à 12 semaines) la virulence des souches et d'évaluer ensuite le profil de biodistribution des candidats thérapeutiques et leurs efficacités pour traiter les infections. Ils seront administrés seuls ou en combinaison avec d'autres antibiotiques. Pour cela nous allons mettre en place différents modèles précliniques mimant l'infection chez l'homme Cette étude comportera 1 procédure légère, 1 procédure modérée et 4 procédures sévères interconnectées et progressives. Quatre modèles précliniques

reproduisant les infections majeures induites par *A. baumannii* en clinique seront mis en place : (i) infections pulmonaires, (ii) infection sanguine (bactériémie), (iii) infection induite par une communauté de bactéries qui se fixent sur une surface (biofilms) et (iii) infections cutanées. Le choix du modèle à déployer se fera en fonction des caractéristiques du candidat antibactérien. Cette étude contribuera ainsi à évaluer des nouveaux antibiotiques qui pourront être déployés chez les patients atteints par des souches multi-résistantes.

L'absence d'un modèle *in vitro* pertinent permettant de reproduire la majorité des interactions bactéries/hôte/antibiotique, nous oriente vers l'utilisation de modèles animaux. Les modèles murins ayant un système immunitaire réduit permettent de mimer plusieurs des syndromes cliniques observés au cours de cette infection chez l'homme, y compris l'infection pulmonaire et la septicémie. Ils sont ainsi prédictifs de la stratégie à déployer chez les patients.

Les souris seront infectées sous anesthésie générale. Elles seront examinées quotidiennement ce qui permettra d'établir un score clinique qui sera établi en fonction de l'observation de plusieurs paramètres: poids, comportement, posture. En fonction des observations et du score clinique associé, des actions seront mises en œuvre progressivement pour assurer un bon niveau de bien-être animal (réchauffement avec couverture chauffante, injection d'analgésique, réhydratation). Le score clinique permettra également de définir un point limite précoce et, en conséquence, de réduire la souffrance de l'animal, i.e. dès le point limite atteint, l'animal sera mis à mort.

Par ailleurs, pour réduire le nombre de souris et améliorer la sensibilité et la spécificité du suivi de la cinétique d'infection/thérapie, les agents infectieux utilisés seront bioluminescents ce qui permettra d'utiliser des systèmes d'imagerie pour suivre l'infection au sein d'un même animal, sans mise à mort de l'animal.

Nous utiliserons des souris ayant un déficit immunitaire ou non (en fonction de la virulence de la souche).

Jusqu'à 1510 souris seront utilisées sur 5 ans (ce nombre minimal d'animaux à inclure pour pouvoir appliquer des tests statistiques pour petits échantillons a été déterminé en collaboration avec des biostatisticiens).

16804 Parmi tous les carcinomes diagnostiqués chez l'homme, le cancer du poumon est celui dont l'incidence est la plus élevée, avec l'un des plus hauts taux de mortalité. Les cancers du poumon font partie des cancers dits ostéophiles. C'est à dire qu'au cours de leur progression ces cancers sont à l'origine de rechutes métastatiques secondaires au niveau du tissu osseux induisant une augmentation pathologique de la calcémie, des fractures osseuses associées à une altération majeure de la qualité de vie des patients. Les mécanismes responsables de la formation et de la progression des métastases osseuses de cancers du poumon sont très mal connus par rapport à d'autres types de cancers tels que les cancers du sein ou de la prostate. La raison provient essentiellement de l'absence de modèles animaux pertinents permettant de reproduire tout ou partie du processus métastatique à l'os des cancers du poumon dans un contexte immunitaire normal. Pour combler ce déficit et pour permettre le développement de nouvelles thérapies des cellules cancéreuses pulmonaires de souris seront injectées directement dans la moelle osseuse du tibia de souris normales. Les animaux seront analysés de façon hebdomadaire par imagerie non invasive (imagerie radiographique) pendant un maximum de 10 semaines afin de limiter le stress des animaux. Le suivi de chaque animal nous permettra d'analyser l'apparition et le rythme de progression des métastases osseuses de cancers du poumon. Pour limiter les contraintes et le nombre d'animaux, le projet procèdera en 2 phases, d'abord une phase exploratoire qui si et seulement si elle apporte des résultats positifs sera suivi d'une phase de validation.

Raffinement - Les règles d'expérimentation seront comme suit. Les souris seront tout d'abord placées en stabulation durant une semaine avant le début du protocole, au sein de l'animalerie d'accueil. Elles cohabiteront par groupe de cinq dans un environnement enrichi, sous surveillance journalière. Tout élément rentrant en contact avec la souris est stérile : nourriture et litière sont irradiées, grilles, cages et biberons sont autoclavés. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière et de la cage s'effectue une fois par semaine par le personnel compétant de l'animalerie. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué quotidiennement. Des solutions

analgésiques seront utilisées pour supprimer la douleur. L'injection des cellules tumorales sera réalisée sous sédation avec des composés anesthésiques. L'observation de signe de souffrance entraînera la sortie du protocole de l'animal.

Remplacement - La dissémination et la croissance des cellules cancéreuses aux sites osseux impliquent les cellules cancéreuses mais également les cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes), les cellules du système immunitaire et le système nerveux sympathique. Par conséquent, l'étude de ces phénomènes *in vitro* en boîte de pétri reste trop artificielle pour mimer la complexité d'un organisme.

Réduction - Afin de réduire le nombre de souris utilisé, le protocole contiendra le nombre total de 24 souris indispensables à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

En outre, l'utilisation de l'imagerie *in vivo* non invasive pour suivre l'évolution des métastases osseuses permettra de réduire le nombre d'animaux requis.

16805 L'obésité et le diabète de type 2 connaissent une croissance alarmante qui ne peut être attribuée uniquement aux modifications individuelles du régime et du mode de vie. Une altération du développement des régions du cerveau impliquées dans la régulation du poids (comme l'hypothalamus) en période périnatale pourrait participer à l'apparition de ces pathologies. Ces altérations prennent place dans un environnement maternel obèse et/ou diabétique.

La production de glucose par l'intestin est une fonction bénéfique pour l'équilibre glycémique, qui, via un relais nerveux, contrôle les fonctions de l'hypothalamus. Chez l'adulte, l'induction de cette fonction protège de l'obésité et du diabète induit par un régime riche en graisses et en sucres. En période périnatale, la production intestinale de glucose connaît une forte induction la deuxième semaine de vie dans une fenêtre temporelle cruciale pour les connections neuronales entre les différents noyaux de l'hypothalamus.

L'objectif de ce projet est d'apporter la preuve que la production intestinale de glucose en période périnatale est indispensable à un développement optimal de l'hypothalamus et permet de protéger des altérations induites par un métabolisme maternel déséquilibré.

Nos études seront réalisées chez la souris avec des individus issus de mère dans un état physiologique (régime standard) et pathologique (régime HF/HS). Le métabolisme glucidique et énergétique sera mesuré *in vivo*, comme chez l'homme, par des tests de tolérance au glucose et à l'insuline, des mesures de glycémie et un suivi de poids et de prise alimentaire. Les souris invalidées pour la production intestinale de glucose développent un phénotype pré-diabétique qui n'est pas considéré comme phénotype dommageable. Les mères soumises à un régime HF/HS développent un phénotype dommageable à partir de 16 semaines de régime. Dans ce projet, elles seront utilisées pour l'accouplement jusqu'à 12 semaines de régime puis mises à mort selon les méthodes autorisées par la législation. Les souris db/db seront étudiées à un stade précoce du développement de l'obésité et du diabète afin de limiter les complications liées à ces maladies.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R:

Remplacement : La production intestinale de glucose contrôle l'hypothalamus via un relais nerveux de l'axe intestin-cerveau. La détection, la transmission et l'intégration de ce signal périphérique sont réalisées par les connections nerveuses entre l'intestin et le cerveau. Ce projet nécessite de conserver ces communication inter-organes et sera donc réalisé *in vivo* dans des modèles de souris transgéniques invalidées pour la production intestinale de glucose. L'impact de cette fonction physiologique sur le développement cérébral sera étudié par marquage immuno-fluorescent des connections nerveuses dans l'hypothalamus à différentes étapes du développement (période périnatale-première semaine de vie ; adulte).

Raffinement : Les souris seront élevées et hébergées par groupe en environnement enrichi et contrôlé avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux seront manipulés régulièrement, observés quotidiennement et pesés toutes les semaines pour suivre leur prise de poids. Les souriceaux ne seront pesés qu'à partir de la première semaine. La connaissance du modèle animal permet de définir des points limites. Dans un souci de raffinement des méthodes, ces souris seront utilisées avant l'aggravation des troubles cliniques liés à leur génotype. 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. La procédure de fixation des cerveaux sera réalisée sous anesthésie avec un prétraitement analgésique des animaux, sans réveil des animaux.

Réduction: Nous avons validé la preuve de concept dans un protocole précédent. Le nombre d'animaux maximum utilisé a été estimé à 550 souris sur une période de 5 ans. Une demande d'utilisation de 120 animaux supplémentaire a été déposée le 24/09/20. Nous avons rencontré des difficultés pour optimiser les naissances, particulièrement la production de groupes bénéficiant d'un environnement maternel homogène. Ces animaux supplémentaires permettront de déterminer comment les connexions nerveuses sont contrôlées dans le cerveau et si ces modifications entraînent une meilleure dépense d'énergie quand l'animal est adulte.

Ces résultats permettront de démontrer l'importance de la production intestinale de glucose en tant que fonction essentielle à la transmission de l'état nutritionnel au cerveau, et permettront d'ouvrir les possibilités bénéfiques de cette fonction à l'amélioration de l'environnement maternel.

16806 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 un ictère évoluant depuis moins de 3 mois et un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) pouvant évoluer vers la décompensation 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 ne restent que partiellement compris. On sait que l'effet direct de l'alcool et de ses produits dérivés génèrent une stéatose, des troubles métaboliques et un relargage de signaux de dangers. 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 recruter d'autres types de globules blancs en provenance de la moelle osseuse. Cet infiltrat constitue ainsi un élément caractéristique de l'hépatite aiguë alcoolique.

À la surface de ces globules blancs, on retrouve plusieurs protéines stimulant l'inflammation, comme la protéine TREM-1 dont on sait aujourd'hui qu'elle joue un rôle important dans l'inflammation et le développement de la fibrose hépatique.

Cette implication de TREM-1 dans l'inflammation a également été démontrée dans de nombreuses maladies inflammatoires ; l'inhibition de la voie TREM-1 par le Nangibotide (LR12), un peptide inhibiteur de la voie TREM-1 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 du peptide inhibiteur de TREM-1, le Nangibotide (LR12) dans le traitement de l'hépatite aiguë alcoolique chez la souris.

La souris demeure le meilleur modèle d'hépatite aiguë alcoolique, et l'administration unique de tétrachlorure de carbone (CCl₄) est devenue une des expérimentations incontournables pour mimer les lésions inflammatoires et les dommages hépatiques dans l'HAA. Il s'agit d'un modèle sûr et robuste permettant des observations reproductibles tout en minimisant le stress pour les animaux qui vont rester largement asymptomatiques.

Dans cette étude, nous souhaitons évaluer le potentiel thérapeutique du peptide inhibiteur de TREM-1, le Nangibotide (LR12) dans le traitement de l'hépatite aiguë induite par le CCl4 chez la souris. À ce jour, l'injection de CCl4 chez la souris reste le meilleur modèle pour mimer les lésions inflammatoires de l'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 156 animaux afin de constituer les différents groupes d'analyses. Initialement, chaque groupe comportera de 6 (témoins) à 15 animaux (traités par CCl4) : 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 une injection intra-péritonéale de CCl4, un toxique connu pour mimer les lésions histologiques d'HAA. Le traitement thérapeutique sera réalisé par injection intra-péritonéale quotidienne du peptide 2 jours avant par un personnel technique qualifié puis le jour de l'injection de CCl4 et le lendemain. Par ailleurs, une procédure d'estimation (avec des paramètres définis) et suppression de la souffrance sera mise en place. Le point limite sera clinique et basé sur l'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.

16807 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 ciblée seront tuées, sans affecter le reste du microbiote.

Les bactéries d'intérêt 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.

Une précédente étude chez le jeune lapin n'a pas permis de sélectionner une souche suffisamment virulente pour provoquer une diarrhée. Des animaux plus jeunes seront utilisés comme modèle pour cette étude.

11 femelles et leur portée ainsi que 4 lapereaux supplémentaires seront nécessaires à cette étude. Une portée correspondant à environ 8 lapereaux le nombre total d'animaux est estimé à 11 lapines et 92 lapereaux.

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 : Une phase de mise au point est prévue afin de perfectionner les paramètres d'anesthésie et d'infection chez le lapereau. Seuls 4 lapereaux seront nécessaires à cette phase. Ainsi, la mère et les autres lapereaux de la portée ne participeront pas à cette étude. Afin d'obtenir la quantité de fèces nécessaire à une analyse microbienne, environ 8 lapereaux par groupe (une portée) seront utilisés pour les phases de sélection de souches bactériennes et d'efficacité du composé antimicrobien. Cette dernière phase sera répétée une seule fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi. Les lapereaux et leur mère ne seront pas séparés durant l'étude pour limiter leur stress et permettre une alimentation naturelle par la tétée. L'infection bactérienne du tube digestif sera réalisée par voie orale et sera donc indolore. Des critères d'arrêts de l'étude, supportés par une grille de score clinique, ont été définis afin d'assurer le bien-être des animaux.

16808 La consommation excessive de viande rouge et de charcuteries est associée à un risque augmenté de développer un cancer colorectal. L'objectif des travaux en relation avec cette demande d'expérimentation animale est d'évaluer les effets des autres composants du régime alimentaire, qu'ils soient potentiellement promoteurs (lipides insaturés) ou protecteurs (antioxydants, fibres) vis-à-vis de l'effet néfaste de ces produits carnés. Nous proposons des expérimentations nutritionnelles de 100 jours chez des rats mâles, dont l'initiation du cancer sera induite chimiquement, pour comprendre l'effet de ces régimes sur le cancer colorectal et les paramètres qui y sont associés (différents marqueurs biochimiques d'inflammation, de stress oxydant, composition de la flore intestinale). Chez ces animaux, les lésions précancéreuses, précoces et indolores, seront dénombrées, sans aller jusqu'au stade tumoral. Ces lésions sont de bons marqueurs du cancer colorectal qui sont largement acceptés par la communauté scientifique. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. Le recours à un modèle animal de cancer est indispensable car aucune étude *in vitro* ne permet d'évaluer l'ensemble des répercussions induites par un régime riche en produits carnés au niveau de l'écosystème colique. Ces expérimentations sans prélèvement sur les animaux hors fèces et urines seront conduites dans le cadre de la règle des trois R. Ce projet utilisera 312 rats sur 4 ans : le nombre des animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante et les conditions expérimentales éviteront toute douleur animale. Si toutefois un animal présentait des signes de souffrance, il serait immédiatement exclu des procédures. Les animaux seront 2 par cage, pour éviter l'isolement et un abri en inox sera installé dans chaque cage, comme enrichissement. L'utilisation de modèle animal est indispensable car aucune étude *in vitro* ne permet l'évaluation complète de l'effet de ces aliments au sein de l'écosystème colique. Les différents volets concernent i) l'effet de différentes huiles alimentaires (riches en acides gras oméga-3 ou oméga-6) additionnées ou non d'antioxydants; ii) l'effet d'ajout de fibres et d'antioxydants sur de la viande rouge grillée ou non ; iii) l'effet de composés végétaux antioxydants, donnés au bétail produisant la viande, capables de réduire la production de gaz à effet de serre et iv) et enfin l'effet d'un mélange protecteur pour pouvoir réduire la teneur en nitrite des charcuteries.

16809 Les maladies d'expansion de glutamine (PolyQ) sont des maladies neurodégénératives génétiques rares. Elles sont dues à des mutations de certains gènes produisant ainsi des protéines aux fonctions altérées. Celles-ci peuvent même être toxiques pour les neurones, conduisant à une mort neuronale progressive. La maladie d'Huntington (MH) est la plus connue des maladies PolyQ. Elle est héréditaire et se caractérise par l'apparition progressive de symptômes moteurs et cognitifs extrêmement invalidants pour les patients, associée à une atrophie du striatum et du cortex cérébral. Cette maladie est en général fatale dans les 15 à 20 ans après la survenue des premiers symptômes. Les ataxies spinocérébelleuses de type 3 et 7 (SCA3 et SCA7), autres maladies PolyQ, se caractérisent par une dégénérescence du cervelet ainsi que de la rétine. Le métabolisme énergétique du cerveau semble altéré pour ces maladies PolyQ.

Il n'existe pour le moment aucun traitement pour ralentir l'évolution de ces maladies chez les patients. Plusieurs partenaires de notre laboratoire ont mis au point des traitements expérimentaux par thérapies

géniques ASOs (pour AntiSense Oligonucleotides) et AAVs (pour Virus Adéno-Associés)) utilisant l'extinction de gènes. Cependant, pour évaluer et comprendre leur efficacité, des biomarqueurs de ces maladies sont nécessaires. De récentes études ont permis de trouver des biomarqueurs précoces qui permettent de suivre l'évolution de la maladie dans certains modèles animaux. Ces biomarqueurs sont des molécules du métabolisme énergétique mesurables avec fiabilité par imagerie non-invasive.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité des traitements proposés en suivant l'évolution de ces nouveaux biomarqueurs par résonance magnétique nucléaire (RMN) et imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM). Le recours à des modèles animaux est nécessaire pour ce projet : aucun milieu de culture ou simulation numérique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité du métabolisme énergétique du cerveau. De plus, l'utilisation d'une souche de rat mimant la forme humaine de la maladie de Huntington permet d'espérer un transfert plus rapide en clinique des méthodes développées. Les modèles rongeurs sont pertinents pour l'étude du cerveau par RMN et IRM, car leur petite taille permet de les examiner dans des scanners IRM à haute performance (IRM très hauts champs). Un total de 9 traitements sont envisagés: 3 ASOs administrés par injection cérébroventriculaire, 3 ASOs par injection intrapéritonéale et 3 AAVs injectés par voie intraparenchymateuse. Les modèles animaux les plus pertinents sont : un modèle de rat Huntington (rats BACHD), et des modèles souris pour les autres maladies. Tous ces modèles ont des phénotypes progressifs bien décrits, cependant es biomarqueurs métaboliques en imagerie n'ont pas été trouvés pour tous les modèles animaux utilisés dans ce projet. C'est pourquoi le projet prévoit une étude préliminaire pour déterminer le meilleur biomarqueur pour chaque modèle.

D'après les études précédentes, ces animaux ne présentent pas de signe de souffrance ni un taux de mortalité plus élevé que des animaux contrôles à l'échelle de temps envisagée dans ce projet (moins de 12 mois). L'administration du traitement sera faite suivant chaque thérapie, soit par chirurgie dans le cerveau des animaux, soit par voie intrapéritonéale, suivant un protocole prenant en charge l'analgésie et l'anesthésie mis au point à l'aide du vétérinaire, L'évolution des biomarqueurs sera mesurée ensuite tous les 2 mois, avec un maximum de 3 passages en IRM. Notre projet vise, par le suivi de ces biomarqueurs, à évaluer l'efficacité des différents traitements et à sélectionner les meilleurs traitements pour un transfert ultérieur vers la clinique devrait permettre de passer certains traitements en phase clinique.

Le nombre maximum d'animaux utilisés pour ce projet sera de 180 rats et 424 souris. Calculé sur la base de 12 animaux par groupe, il a été déterminé à partir de nos précédents travaux pour obtenir des résultats significatifs et exploitables. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettront de veiller au bien-être des rongeurs.

16810 Au cours du développement et de l'évaluation préclinique de candidats médicaments, la communauté scientifique a besoin de produits biologiques d'origine animale. Ces produits biologiques sont nécessaires lors de la mise au point / validation de méthodes analytiques ou pour des analyses effectuées dans les études précliniques ou pour des essais *ex vivo* préalables aux études réglementaires *in vivo*. Ce projet a pour but de mettre à la disposition des chercheurs ou de l'industrie pharmaceutique divers produits biologiques (sang et ses dérivés, urines, fèces, liquide cébrospinal, biopsies d'organes...) en provenance du chien, miniporc et primate non humain. Le primate ne sera utilisé que lorsque le chien et le miniporc ne sont pas pertinents. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode *in vitro* permettant de synthétiser ces produits biologiques. Les essais *ex vivo* réalisés en amont des études précliniques *in vivo* s'inscrivent dans une stratégie 3R car ils permettent de caractériser le candidat médicament (sélection du meilleur candidat, connaissance du profil métabolique, pharmacologique et toxicologique) avant de démarrer les essais sur l'animal.

Le prélèvement des produits biologiques se fera dans le respect des recommandations éthiques (volume sanguin prélevé et de temps de récupération notamment). Afin d'améliorer le bien-être animal, certains prélèvements (autres que sang, urine, selles, ...) pourront être réalisés après une anesthésie locale ou générale de l'animal avec un protocole analgésique adapté. Des points limites précoces et adaptés seront appliqués.

Les animaux seront hébergés dans des conditions environnementales adaptées à leur espèce, en groupes sociaux dès que cela est possible (chien, miniporc femelle et primate non humain) et dans un milieu avec un enrichissement adapté à l'espèce : litière, panier et chainettes pour le miniporc - exercice en courette et jeux pour le chien – perchoirs, barrières visuelles, jouets en plastiques et à ronger, balancelles pour les primates non humains).

Le nombre d'animaux utilisé sera défini au plus juste en fonction des volumes de produits demandés et des recommandations éthiques et est estimé à 635 animaux (175 chiens, 175 miniporcs et 285 primates non humains). Dès que possible et à des fins de réduction, les prélèvements se feront sur des animaux provenant d'un projet antérieur.

16811 Les édulcorants de synthèse non caloriques sont commercialisés avec le potentiel bénéfique de ne pas induire de pic hyperglycémique et les troubles cardiométaboliques associés. Cependant, des études observationnelles très récentes démontrent une association entre la consommation de produits contenant des édulcorants et des perturbations du métabolisme glucidique, de l'appétit et beaucoup plus grave, un risque accru de mortalité notamment d'origine cardiovasculaire. Il y a donc un besoin urgent de tester le rapport de causalité entre consommation d'édulcorants et la santé et de mieux comprendre les mécanismes physiologiques sous-jacents.

Notre laboratoire ainsi que d'autres, avons récemment mis en évidence la présence de récepteurs T1Rs au gout sucré dans la paroi vasculaire. Ces récepteurs, initialement identifiés dans la bouche et le tractus digestif, sont responsables du gout sucré des édulcorants. Cependant, leur rôle physiologique dans le système cardiovasculaire est totalement inconnu. Dans le projet ci-joint, nous faisons l'hypothèse que ces T1Rs activés par les édulcorants impactent directement la physiologie vasculaire et pourraient via ce mécanisme avoir des conséquences négatives sur la santé cardiovasculaire et in fine sur la survie. Ce projet a pour objectifs:

- Générer des données expérimentales. Ce type d'étude manque cruellement sur le sujet où la plupart des données existantes sont des données observationnelles.
- Mieux comprendre le métabolisme des édulcorants et la biologie de leurs récepteurs au niveau cardiovasculaire

La première étape devra permettre d'élaborer la preuve de concept que les édulcorants ont un impact sur la fonction vasculaire. Ce volet, conduit sur un total de 32 rats, comportera une étude de la biodisponibilité des édulcorants ainsi qu'un screening des effets aigus du du sucralose et de l'acesulfame K sur les fonctions hémodynamiques (évaluation des pressions artérielle et intracardiaque).

La deuxième étape, conduite sur un total de 320 souris, sera dédiée à l'étude des effets chroniques de l'ingestion d'édulcorant sur le métabolisme et la fonction vasculaire de souris saines et rendues obèses. L'exposition consistera en un régime de 16 semaines avec ajout de sucralose 0,017% dans l'eau de boisson (gout sucré équivalent au groupe recevant uniquement du saccharose 10%). L'impact de ce régime sur les animaux sains et obèses sera évalué sur des paramètres métaboliques (insulino résistance, tolérance au glucose, dosage lipidique, index d'adiposité...), inflammatoires (cytokines) et sur la fonction vasculaire in-vivo et ex-vivo en comparaison avec des groupes contrôles (eau ; saccharose). Pour tester l'implication des récepteurs au gout sucré T1Rs, ces groupes seront conduits à la fois sur souris wild type et souris KO pour le gène T1R3. Cette étude constituera la première étude exploratoire sur le sujet. Etant donné les alertes émises par les études observationnelles, les résultats attendus pourraient conduire à réévaluer les recommandations de suppléer la consommation de sucres par certains édulcorants de synthèse chez les sujets à risque, notamment obèses et/ou diabétiques, mais également chez les sujets sains.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs : Remplacement : A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier les effets d'une consommation d'édulcorants sur la fonction vasculaire. En effet, les altérations de la fonction vasculaire chez les sujets atteints d'une pathologie métabolique résultent d'un ensemble complexe d'interactions entre les différents tissus et impliquent des processus biologiques d'origine aussi bien systémiques que locales, évoluant suivant le développement de la pathologie. Les effets de la consommation des édulcorants sur la fonction

vasculaire pourraient ainsi impliquer un effet systémique. Le rat et la souris sont des modèles de choix car ils présentent des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'homme. Réduction : Malgré une diversité non négligeable de molécules édulcorantes, avec des propriétés et des impacts biologiques potentiellement différents nous nous concentrons sur les deux édulcorants les plus représentés dans les boissons le sucralose et l'acesulfame K afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes. Raffinement : Afin de réduire le stress, il a été prévu d'utiliser un enrichissement de l'environnement sous forme d'igloos, de tubes, de coton pour permettre la création de nids et de bâtonnets en bois à ronger, un maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien afin de prendre les mesures évitant toute souffrance éventuelle. La souffrance, la détresse ou l'inconfort réel ou potentiel seront minimisés en choisissant le point limite d'utilisation le plus précoce possible. Lors des anesthésies nécessaires pour l'étude de la microcirculation cutanée et des échocardiographies, une anesthésie à l'isoflurane est privilégiée avec l'application d'un onguent ophtalmologique.

16812 Malgré le développement massif de nouvelles thérapies, le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde. Les tumeurs sont des tissus très hétérogènes dans lesquels différents types de cellules cancéreuses coexistent. Parmi tous ces types, il existe un petit sous-ensemble de cellules qui sont les principales responsables de la croissance des tumeurs et qui sont appelées cellules souches cancéreuses (CSC). Les CSC ont été désignées comme des cibles prometteuses pour le traitement anticancéreux et, de fait, leur destruction arrête temporairement la croissance des tumeurs. Cependant, après l'arrêt du traitement, d'autres cellules, les non souches cellules cancéreuses (non-CSC) deviennent rapidement des CSC, ce qui souligne la nécessité de comprendre les signaux qui déclenchent l'apparition des cellules souches. La recherche actuelle porte principalement sur la façon dont les signaux chimiques déclenchent l'apparition des CSC. Cependant, les CSC se trouvent incluses dans une matrice extracellulaire (composants non-cellulaires dans les tissus qui forment un échafaudage essentiel pour les constituants cellulaires) qui exerce alors des forces sur ces cellules, forces d'autant plus intenses que cette matrice est rigide. Le rôle des signaux physiques dans l'apparition des CSC reste largement inexploré. Il a été démontré que les signaux physiques tels que la rigidité de la matrice extracellulaire contrôle de nombreuses fonctions cellulaires, ce qui nous amène à émettre l'hypothèse qu'ils déclenchent également l'apparition des CSC.

Pour comprendre le rôle des signaux physiques, nous utiliserons des cellules tumorales de souris dans lesquelles nous pourrions identifier les CSC en temps réel. Nous étudierons l'apparition des CSC à l'aide de systèmes modèles *in vitro* dans lesquels nous pouvons contrôler différents paramètres physiques de façon indépendante. Toutefois, il est également nécessaire de déterminer si les propriétés physiques du microenvironnement peuvent stimuler le développement du CSC dans des systèmes plus complexes, ce qui est impossible à récapituler entièrement *in vitro*. De plus, la métastase est une maladie systémique qui implique la dissémination des cellules cancéreuses d'un organe à l'autre qui ne peut pas être entièrement modélisée *in vitro*. La souris est très proche de l'homme, génétiquement mais aussi au niveau métabolique, ce qui en fait un excellent modèle pour l'étude de pathologies humaines tel que le cancer.

Pour répondre à la question de l'influence de la rigidité de la matrice extracellulaire, nous modifierons la rigidité de la matrice et nous regarderons l'effet sur les CSC (leur apparence, leur croissance et leur survie) ainsi que sur la conversion des non-CSC en CSC. Pour étudier l'influence des cellules cancéreuses dans le remodelage de la matrice extracellulaire lors de l'apparition des métastases, nous générerons des tumeurs en injectant des cellules cancéreuses contenant des cellules souches dans la muqueuse du côlon. Nous observerons l'effet sur l'apparition des CSC en utilisant une fenêtre d'imagerie installée au niveau de l'abdomen de la souris. Enfin, nous étudierons si le remaniement de la matrice extracellulaire joue un rôle dans la conversion des non-CSC en CSC. Toutes les précautions seront prises pour minimiser la souffrance, par exemple : anesthésie pendant les procédures chirurgicales, administration d'analgésiques pré-opératoires et post-opératoires et surveillance particulière des souris. Le nombre de souris utilisées est ajusté au plus petit nombre compatible avec

l'obtention de résultats pertinents. Le nombre de souris nécessaire à ce projet est évalué à 146 souris sur 5 ans. Les expériences proposées permettront de déchiffrer les signaux qui influent sur la croissance des tumeurs, cela afin de mettre en évidence de nouveaux mécanismes du cancer.

16813 L'organisation mondiale de la santé considère aujourd'hui le diabète comme une priorité sanitaire. Environ 5% des patients diabétiques souffrent du diabète auto-immun de type 1, maladie métabolique la plus fréquente chez l'enfant dans les pays développés. De nos jours, il n'existe pas de traitement curatif sûr pour cette pathologie. Le diabète auto-immun de type 1 résulte de l'agression de la cellule bêta du pancréas produisant de l'insuline par les lymphocytes T reconnaissant des auto-antigènes. De nombreux chercheurs pensent que les lymphocytes T CD8 + pathogènes qui jouent un rôle clé dans la destruction des cellules bêta, sont des cibles intéressantes pour une intervention thérapeutique et que leur analyse pourrait aider à estimer le risque de l'apparition de la maladie.

Pour pouvoir cibler les lymphocytes pathogènes, il est d'abord nécessaire de les identifier et les distinguer des lymphocytes non pathogènes. Cependant la caractérisation des lymphocytes T dans le diabète auto-immun reste insuffisante. L'hypothèse sous-jacente de ce projet est que l'immunisation active avec des protéines des cellules bêta peut aider à obtenir une caractérisation plus approfondie des lymphocytes T pathogènes, en augmentant leur nombre et en synchronisant leur état fonctionnel.

Les modèles animaux représentent un outil incontournable dans l'étude du diabète de type 1, en effet les mécanismes immuno-pathologiques découverts à l'aide des modèles murins sont souvent similaires chez l'Homme. Aucun modèle *in vitro* alternatif n'est disponible pour étudier ces mécanismes. Étant donné que le paramètre principal étudié dans ce projet est la survenue d'une maladie résultant d'un ensemble complexe d'acteurs cellulaires et de médiateurs solubles, il est impossible de remplacer le modèle de la souris.

Notre stratégie sera donc d'immuniser des souris non-obèses diabétiques, modèle communément considéré comme très proche de la maladie humaine, avec différents antigènes des cellules bêta, puis de comparer l'effet de ces immunisations sur le taux et la rapidité de développement du diabète chez les groupes de souris immunisées avec les différents antigènes. La caractérisation des lymphocytes de souris développant un diabète plus agressif ou rapide nous permettra d'identifier le profil des lymphocytes T pathogènes. Les données de la littérature indiquent que l'injection de l'ADN nu (plasmides), codant pour les antigènes sélectionnés, sera l'approche la plus efficace pour obtenir une immunisation efficace.

Sur la base de données préliminaires, nous suspectons qu'une protéine (bêta amyloïde; BA) impliquée dans la maladie d'Alzheimer et qui est fortement liée au diabète non auto-immun, pourrait avoir un effet diabétogène dans le diabète auto-immun. Nous souhaitons donc interroger son rôle potentiellement pathogénique dans le modèle de la souris NOD (non-obèse diabétique).

Toutes les expérimentations sur l'animal seront conduites en respectant la règle des « 3 Rs ». 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 robustes. Ces procédures incluent des injections intramusculaires, des prélèvements de sang pour analyser les cellules immunitaires circulant et l'injection de cellules du sang, obtenues à partir de souris immunisées, dans des souris immunodéficientes, pour analyse de leur capacité à transférer un diabète. Globalement notre objectif sera d'examiner notre hypothèse d'un potentiel pathogène d'une réponse immune dirigée contre la BA dans le diabète insulino-dépendant.

Cette étude, prévue pour 5 ans, nécessitera au total 630 souris. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. L'état général de l'animal, la perte de poids, l'apparence et le comportement de l'animal seront suivis quotidiennement après les traitements. L'accès à l'eau à volonté assurera une bonne hydratation aux animaux diabétiques.

Nous espérons que cette étude apportera un nouvel éclairage sur le lien fort et bien documenté existant chez l'Homme, entre la maladie d'Alzheimer et le diabète, en l'étendant au diabète de type 1.

16814 La respiration est une fonction indispensable à la survie. Des défauts de respiration sont fréquents, par exemple chez les patients atteints d'apnées de sommeil ou chez des nouveau-nés immatures,

également mais plus rarement, chez des patients atteints de maladies génétiques. Notre compréhension du contrôle nerveux de la respiration a progressé au cours des dernières années, mais reste très incomplète. Nous « disséquons » ces circuits nerveux respiratoires chez la souris par des outils génétiques permettant d'enregistrer, d'interférer avec l'activité et de caractériser la connectivité de population neuronales choisies. Nous avons récemment montré le rôle crucial, joué à la naissance, par un groupe de neurones du tronc cérébral - le noyau rétrotrapézoïde (RTN)– dans le contrôle réflexe de la respiration en réponse à une élévation des taux de gaz carbonique du sang (chémoreflexe). Un déficit de cette structure est vraisemblablement responsable du syndrome congénital d'hypoventilation centrale (CCHS), une maladie rare dont les symptômes sont sévères : perte du chémoréflexe et apnées. Nous avons découvert un code moléculaire identifiant les neurones du RTN.

Le but du présent projet est d'analyser l'unique autre groupe de neurone du cerveau qui possède ce même code moléculaire, ce groupe nommé Péri5 et est aussi localisé dans le tronc cérébral. Son rôle fonctionnel est inconnu, certains arguments suggèrent qu'il pourrait aussi être impliqué dans le contrôle de la respiration et que son déficit combiné à celui du RTN pourrait aggraver les symptômes du CCHS et expliquer sa morbidité.

Des mesures physiologiques de la respiration seront réalisées. Nous utiliserons aussi des technologies modernes d'imagerie fonctionnelle et de traçage des circuits neuronaux. Cette étude nécessite de recourir à l'expérimentation animale car aucune autre approche expérimentale ne permet de modéliser le fonctionnement intégré des systèmes neuronaux du tronc cérébral des vertébrés. La souris est la seule espèce mammifère permettant facilement la production d'animaux transgéniques et donc le ciblage de populations neuronales.

Nous avons mis en pratique plusieurs méthodes qui nous permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés conformément à la règle des 3 R.

Remplacement : Un mécanisme physiologique complexe comme la respiration peut être étudié uniquement *in vivo* ou *ex vivo*. Réduction : Nous réduisons le nombre de souris, en amont (i) en optimisant les génotypes des reproducteurs afin d'obtenir plusieurs individus nouveau-né du génotype souhaité par femelle gestante et par la ré-utilisation d'animaux lorsque cela est possible, en aval (ii) en réalisant des coupes anatomiques en triplicat permettant d'effectuer plusieurs analyses histologiques sur le matériel en provenance d'un même individu, enfin, l'étude anatomique réalisée s'affranchit de comparaison avec des animaux « contrôles ». Raffinement : Les souris sont hébergées dans des cages enrichies (mouchoir papier, cylindres en cartons ou des tentes ajourées) sur des portoirs ventilés dans l'animalerie de l'IBENS avec nourriture et eau *ad libitum*. Les génotypes des individus reproducteurs ne présentent aucun déficit fonctionnel. Pour part, les individus issus de croisement peuvent être identifiés sans recours à des analyses par PCR à partir de biopsies par simple exposition de l'animal à une lumière de longueur d'onde spécifique et observation d'un marquage fluorescent au niveau de la tête en provenance du cerveau chez les souriceaux nouveau-nés. Pour réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux pendant les procédures expérimentales, les souriceaux seront anesthésiés par une hypothermie rapidement réversible. Le réveil des souriceaux se fera sur une partie de la litière de la cage d'origine à température ambiante (10 minutes) puis sur tapis chauffant (10 minutes à 38°C). Nous vérifierons la reprise de la ventilation (transition gasping/eupnée), la perte du profil cyanotique, la reprise d'activité locomotrice avant de les ré-introduire dans la cage maternelle. Le remplacement dans la cage maternelle au sein de la portée est une stratégie antalgique efficace par « cocooning » et allaitement maternel en l'absence d'antalgiques pharmacologiques efficaces chez le souriceau nouveau-né. Pour minimiser le risque de rejet des nouveaux nés par la mère après manipulation, les animaux testés seront replacés dans la cage à l'extrémité opposée au nid. Ceci favorise un "comportement de prise en charge" de la part de la mère qui doit se déplacer puis ramener les souriceaux jusqu'au nid. Le nombre total d'animaux nécessaires à la réalisation des objectifs de ce projet sera 415.

16815 Le projet a pour but d'étudier le rôle des voies nerveuses qui contrôlent la transmission douloureuse au niveau de la moelle épinière. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est crucial pour l'amélioration du quotidien des patients et la prise en charge de leurs symptômes de douleur. Les contrôles de la douleur ne sont plus fonctionnels dans le contexte pathologique et les traitements qui

ciblent ces contrôles (comme les opiacés) deviennent inefficaces et dangereux (augmentation dramatique du nombre de mort par overdoses aux opiacés aux USA ces 10 dernières années).

Ce projet vise à étudier le rôle des neurones du tronc cérébral dans le contrôle de la douleur en utilisant des approches innovantes comme l'optogénétique qui consiste à utiliser la lumière pour activer des neurones. Nous analyserons plus particulièrement les réponses comportementales sensorielles (mécanique et thermique) chez la souris ainsi que l'activité électrique des neurones de la moelle épinière et leur modulation par les neurones du tronc cérébral.

Pour cela, nous proposons d'utiliser des souris transgéniques sans phénotype nocif qui expriment l'enzyme Cre-recombinase dans des populations de neurones particuliers (dopamine, sérotonine, gaba ou glutamate), ce qui nous permettra de ne rendre sensible à la lumière que la population de neurones d'intérêt uniquement dans le tronc cérébral (zone du cerveau).

Pour cela grâce à une chirurgie stéréotaxique sous anesthésie, nous injecterons dans cette zone cérébrale un vecteur viral de type adénovirus contenant le gène de protéines particulières appelées opsines sensibles à la lumière et qui en changeant de forme vont contrôler l'activité des neurones. Les neurones seront stimulés à l'aide d'une fibre optique implantée par chirurgie stéréotaxique sous anesthésie et qui transmettra la lumière dans le tronc cérébral. Nous observerons les conséquences de ces stimulations sur le comportement sensoriel et l'activité électrique des neurones de la moelle épinière.

Des animaux seront soumis à des procédures de sensibilisation de la moelle épinière au moyen de chirurgie du nerf sciatique mimant la pathologie douloureuse de type neuropathique et par l'injection de CFA mimant l'inflammation chez l'homme et la manipulation des neurones cibles permettra d'étudier leur rôle dans ces conditions pathologiques. Les résultats de ce projet donneront des pistes thérapeutiques cruciales dans le traitement des douleurs chroniques qui sont réfractaires aux traitements et qui touchent jusqu'à 25% de la population générale.

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. Des médicaments anti douleur sont administrés avant la chirurgie et dont l'effet dure plusieurs heures après. Les animaux seront ensuite surveillés quotidiennement par l'expérimentateur avec une surveillance renforcée après la chirurgie, avec l'administration d'anti-douleur, réhydratation et réchauffement. Des points limites sont définis pour éviter la souffrance des animaux. Les animaux sont hébergés en cages collectives, un enrichissement de leur milieu est prévu en installant des rouleaux en carton que les animaux peuvent utiliser pour se cacher ou ronger. Les Zootechniciens ont le niveau initial d'expérimentation pour la prise en charge du change et le maintien des animaux et le personnel impliqué dans le projet est formé et compétent, il possède la formation chirurgie et « concepteur »

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 des pathologies étudiées.

La réduction du nombre d'animaux (R de réduire) est prise en compte tout en conservant une signification statistique scientifique qui tient compte de l'hétérogénéité inter-individuelle. Le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 10 animaux par groupe. La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite au total l'utilisation de 620 souris mâles ou femelles.

- 16816** L'objectif de notre étude est de démontrer que le microbiote intestinal (les bactéries localisées au sein de notre intestin) participe à l'amélioration du diabète de type 2 (DT2) observée après chirurgie bariatrique. Pour ce faire, nous comptons réaliser des expériences de transplantations de fèces de patients ayant eu une chirurgie bariatrique et qui étaient atteints d'un DT2 avant l'opération. Quatre patients en rémission complète (critères diagnostiques du DT2 normaux) ainsi que 11 patients restés diabétiques après leur chirurgie seront sélectionnés sur la base de leurs profils cliniques (perte de poids, amélioration de la glycémie, etc) et métagénomique (composition de leur microbiote en termes de type de bactéries). Le microbiote intestinal de chacun de ces 15 patients sera transféré à un groupe de 4 souris, ce qui porte le nombre total d'animaux nécessaire pour ce projet à 60.

Compte tenu de la variabilité importante de la composition du microbiote intestinal des patients, un nombre total de 15 patients est adapté afin d'obtenir des résultats comparables et une puissance statistique satisfaisante.

Le transfert sera réalisé à partir des selles collectées 5 ans après la chirurgie et préparée de manière standardisée puis stockées à -80°C afin de conserver au mieux la viabilité bactérienne. Le transfert de microbiote humain chez la souris sera réalisé chez la souris conventionnelle juste sevrée (3 semaines d'âge) ayant été prétraitée par un cocktail antibiotique à large spectre (ampicilline, néomycine, métronidazole) afin de favoriser l'implantation du microbiote humain. Pour chaque condition expérimentale (rémission vs non-rémission), des groupes de 4 souris seront constitués, ce qui fait un total de 60 souris.

Vis à vis de la règle des 3R, l'utilisation d'autre modèle que l'in-vivo (tel que l'intestin in-vitro) n'est pas adaptée à l'étude causale de l'implication du microbiote intestinal dans les processus physiopathologiques (inflammation, insulino-résistance, immunité) liés au diabète de type 2 et sa résolution. Par rapport à la réduction, notre design expérimental correspond au nombre minimal de groupes et de souris nécessaires afin d'obtenir des résultats scientifiquement pertinents et statistiquement fiables. 12 à 16 souris par groupe (4 par patient) est le nombre minimal permettant d'obtenir des résultats (i) statistiquement interprétables, compte tenu de la variabilité interindividuelle des paramètres mesurés (poids, tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline) et de l'implantation du microbiote intestinal humain, tout en permettant d'avoir (ii) un nombre de patient donneur conséquent afin d'éviter des soucis de pseudo-réplication donneur-receveur. 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. 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.

Après l'inoculation du microbiote humains au sein des différentes conditions, nous allons évaluer la qualité du transfert de microbiote ainsi que les interactions entre la souris hôte et son microbiote. La qualité du transfert est tout d'abord évaluée par le degré de similarité entre la composition du microbiote des patients et celle de celui des souris receveuses. Nous allons donc prélever les fèces des souris plusieurs fois au long de l'expérience et analyser la composition de leur microbiote par séquençage haut débit. Le deuxième critère de réussite du transfert de microbiote est la genèse et/ou la prévention d'apparition d'altérations métaboliques chez la souris receveuse. Pour évaluer l'altération/la protection métabolique des receveuses nous allons suivre leur prise de poids durant 11-12 semaines en les pesant une fois par semaine et en mesurant leur prise alimentaire. D'un point de vue du métabolisme glucidique, des techniques classiques telles que les tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline seront utilisées en suivant les méthodes recommandées par la littérature.

16817 La respiration est une fonction indispensable pour la survie. Des défauts de respiration sont fréquents, par exemple chez les patients atteints d'apnées de sommeil ou chez des nouveau-nés immatures, également, mais plus rarement, chez des patients atteints de maladies génétiques. Notre compréhension du contrôle de la respiration a progressé au cours des dernières années, mais elle est encore très incomplète. Nous appliquons les approches de génétique de la souris pour disséquer les circuits nerveux contrôlant la respiration chez les mammifères. Plus précisément, nous recherchons les caractéristiques moléculaires des neurones qui constituent le réseau respiratoire chez la souris. Ce projet est plus particulièrement dédié à l'analyse de neurones qui sont actifs durant une phase précise de la respiration qui succède immédiatement l'inspiration: la phase dite post-inspiratoire au cours de laquelle se réalisent les très importants comportements de déglutition et de vocalisation.

Notre stratégie de caractérisation repose sur une identification des neurones par le type de neurotransmetteur qu'ils libèrent à la synapse et par le type de cellule embryonnaire (progéniteur) dont

ils dérivent au cours du développement. Dans les deux cas cette identification repose sur des croisements génétiques par lesquels les expressions des gènes codant les caractéristiques moléculaires (type de neurotransmetteur et/ou type de progéniteur) sont directement visualisables par microscopie permettant ainsi le repérage spatial des structures nouvellement identifiées au sein du réseau neuronal respiratoire.

La règle des trois R sera suivie de la manière suivante. Remplacement : la structure fine d'un réseau neuronal supportant un mécanisme physiologique complexe comme la respiration ne peut être étudiée qu'*in vivo*. Réduction : Nous réduisons le nombre de souris utilisées, en amont (i) en optimisant les génotypes des reproducteurs afin d'obtenir plusieurs individus nouveau-nés du génotype souhaité par femelle gestante, en aval (ii) en réalisant des coupes anatomiques en triplicats permettant d'effectuer plusieurs analyses histologiques sur le matériel en provenance d'un même individu, enfin, l'étude anatomique réalisée s'affranchit de comparaison avec des animaux « contrôles ». Raffinement : Les souris sont hébergées dans des cages enrichies (mouchoir papier, cylindres en cartons ou des tentes ajourées) sur des portoirs ventilés dans l'animalerie de l'IBENS avec nourriture et eau ad libitum. Pour réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux pendant les procédures expérimentales, les souriceaux seront anesthésiés par une hypothermie rapidement réversible. Le réveil des souriceaux se fera sur une partie de la litière de la cage d'origine à température ambiante (10 minutes) puis sur tapis chauffant (10 minutes à 38°C). Nous vérifierons la reprise de la ventilation (transition gasping/eupnée), la perte du profil cyanotique, la reprise d'activité locomotrice avant de les ré-introduire dans la cage maternelle. Le remplacement dans la cage maternelle au sein de la portée est une stratégie antalgique efficace par « cocooning » et allaitement maternel en l'absence d'antalgiques pharmacologiques efficaces chez le souriceau nouveau-né. Pour minimiser le risque de rejet des nouveaux nés par la mère après manipulation, les animaux testés seront replacés dans la cage à l'extrémité opposée au nid. Ceci favorise un "comportement de prise en charge" de la part de la mère qui doit se déplacer puis ramener les souriceaux jusqu'au nid. Ce projet utilisera 160 souris.

16818 Si les antibiotiques ont profondément transformé la médecine du 20^{ème} siècle, leur utilisation généralisée a conduit à l'apparition puis à la dissémination de bactéries résistantes. Dans le même temps, l'effort de recherche de nouveaux antibiotiques s'est effondré. Apparaissent ainsi aujourd'hui des bactéries résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Les infections sont donc de plus en plus difficiles à contrôler, et les traitements standards de moins en moins efficaces. Dans ce contexte, la mise au point de nouveaux composés anti-infectieux est critique et encouragée par les organisations telles que l'OMS, et les Centers for Disease Control and Prevention américain et européen. De tels composés sont préalablement conçus et caractérisés *in vitro* avec pour objectifs d'optimiser leur originalité, leur puissance, leur spectre d'action, et leur fenêtre de sécurité. Ces batteries de tests *in vitro*, utilisant des enzymes isolées, des bactéries et des cellules isolées permettent de ne retenir que les composés suffisamment puissants et les moins toxiques. Mais ces données ne suffisent malheureusement pas pour prédire l'efficacité de ces composés chez l'homme.

Ce projet vise plus particulièrement à déterminer les paramètres pharmacocinétiques de ces nouveaux composés anti-infectieux chez l'animal, donc n'ayant pas déjà fait l'objet de telles études auparavant.

La pharmacocinétique (PK) c'est l'étude du devenir d'une substance active contenue dans un médicament dans l'organisme après son ingestion ou son administration. Ainsi, la détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future. L'étude de ces paramètres chez l'animal est très importante et ne peut pas être réalisée *in vitro* faute de modèle suffisamment complet pour prendre en compte les nombreux paramètres qui entrent en jeu dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination d'un composé chez un animal ou un homme.

Les études d'efficacité des antibiotiques étant réalisées principalement dans des modèles animaux chez le rongeur (souris, rat ou hamster, selon l'infection bactérienne ciblée) nous avons besoin de modèles qui nous permettent de relier le devenir d'un composé anti-infectieux dans un organisme à son activité observée *in vivo* (pharmacodynamie), et de prédire son activité chez l'homme.

Pour cela, nous étudierons donc la pharmacocinétique de nouveaux composés chez la souris, le rat ou encore le hamster adulte. Sur les 5 ans, nous prévoyons d'utiliser au maximum 5525 animaux à raison

de 4375 souris, 800 rats et 350 hamsters. Les paramètres pharmacocinétiques pourront être évalués dans quatre cas distincts 1) un suivi des concentrations sanguines d'un composé sur 24 heures après administration, 2) un suivi des concentrations sanguines ainsi que dans les organes d'un composé sur 24 heures après administration, 3) un suivi des concentrations sanguines sur plusieurs jours dans le cas d'une administration répétée ou par perfusion continue, 4) une étude croisée avec deux phases de suivi des concentrations sanguines sur 8 heures après administration, avec une semaine de repos intercalaire. Afin de permettre une analyse fiable des données, 3 à 40 animaux seront utilisés suivant les cas et les paramètres analysés. Cet effectif est basé sur notre expérience en matière de recherche sur les composés anti-infectieux, la littérature dans ce domaine, et l'analyse statistique. Le nombre d'animaux par groupe est réduit au minimum et prend en compte la variabilité entre les animaux que l'on observe dans l'analyse des données pharmacocinétiques. Le nombre total d'animaux utilisés doit permettre de caractériser sur les 5 années de la durée du projet les candidats antibactériens issus de notre recherche, et de sélectionner les meilleurs pour les faire progresser vers les phases cliniques.

Le projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. Les animaux sont hébergés dans des conditions répondant à leurs besoins, avec des enrichissements de milieu, et manipulés délicatement. Ils font l'objet d'observations quotidiennes. Une grille d'observation des signes cliniques et l'arbre décisionnel correspondant sont mis en place afin de limiter la douleur, d'optimiser le bien-être animal.

16819 Les maladies métaboliques du foie représentent plusieurs syndromes qui vont de la simple stéatose hépatique à la stéatose hépatique inflammatoire (stéatohépatite) pouvant évoluer vers la fibrose, la cirrhose et le cancer hépatocellulaire. La stéatose hépatique est très fortement associée à l'obésité, la glucotoxicité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Les voies métaboliques, qui peuvent conduire au stockage excessif de lipides dans le foie (principalement des triglycérides), sont multiples et peuvent être liées à une augmentation exacerbée de la lipolyse adipocytaire, une synthèse accrue de la synthèse de novo des acides gras par la voie de la lipogenèse ainsi qu'à une réduction conjointe de la β -oxydation des acides gras. Dans ce projet, nous caractériserons des modèles de souris génétiquement modifiés et/ou exprimant de manière ciblée dans le foie (approche adénovirale) des cibles moléculaires précises dans le but d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la stéatose hépatique, et des syndromes qui lui sont associées comme la glucotoxicité et la résistance à l'insuline. De plus, le foie stéatosé, en condition d'obésité et de résistance à l'insuline, voit son fonctionnement altéré au niveau de son métabolisme mais aussi de son sécrétome. Le concept d'hépatokines est très récent et notre projet vise également à caractériser les hépatokines connues pour leurs effets sur le métabolisme énergétique et la sensibilité à l'insuline mais aussi à identifier de nouvelles hépatokines. Les hépatokines pouvant être soit bénéfiques soit délétères, elles pourraient être le chaînon manquant entre la stéatose et la résistance à l'insuline. Dans ce contexte, nous utiliserons des lignées de souris génétiquement modifiées dont le phénotype n'est pas dommageable. Pour développer une stéatose hépatique, les souris seront nourries avec différents types de régimes stéatogènes (cétogéniques, hyperlipidiques, riches en hydrates de carbone ou de fructose) et nous analyserons l'impact les changements des paramètres métaboliques en réalisant des tests fonctionnels dont certains sont non-invasifs. Nous utiliserons le modèle murin. Le nombre de souris utilisées pour ce projet sera de 1790. Nous serons très attentifs à ce que notre démarche expérimentale soit en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement selon la règle des 3R. Concrètement, lorsque cela est possible, les expériences sont réalisées sur lignées de cellules afin d'éviter l'utilisation d'animaux. Tout au long de cette étude, nous réévaluerons la possibilité de faire appel à des méthodes alternatives et des modèles *in vitro* afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux. Les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement pensés et élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et le stress infligés aux souris, une surveillance journalière des animaux sera réalisée en respectant des points limites bien définis, 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 moléculaires impliqués dans le développement de la stéatose hépatique, la glucotoxicité,

la résistance à l'insuline et aideront à la caractérisation et/ou l'identification d'hépatokines clefs du contrôle du métabolisme énergétique.

16820 Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules cruciales de l'immunité, permettant de faire le lien entre l'immunité innée et adaptative via la présentation d'antigènes et l'orchestration des cellules effectrices. Les monocytes et macrophages sont des phagocytes permettant le nettoyage des débris cellulaires ou des microorganismes. Ces cellules peuvent aussi développer des fonctions similaires à celles des cellules dendritiques.

Les patients septiques présentent, suite à la présence systémique d'une toxine exogène ou endogène, une inflammation non contrôlée pouvant mener à des dysfonctions de certains organes et à la mort des patients. Cette phase pro-inflammatoire est de mieux en mieux prise en charge au sein des unités de soin intensifs, cependant elle est suivie d'une phase d'immunosuppression persistante, associée au développement de maladies nosocomiales. Il a été montré que les patients septiques présentent un déficit de DC au profit des lignées monocytaires. De plus, les cellules de la lignée monocytaires et les DC isolées de patients septiques présentent un profil immunosuppresseur.

Ces effets peuvent être retrouvés dans un modèle murin d'endotoxémie où la seule présence systémique de lipopolysaccharides bactériens (LPS) induit une forte inflammation, la diminution des DC au profit des monocytes et le profil immunosuppresseur des cellules immunes. De plus, il a été montré que le transfert adoptif de DC, tout comme l'inhibition de leur apoptose, permettait de diminuer le profil immunosuppresseur des souris endotoxémiques et d'augmenter leur survie en cas d'infections secondaires.

Les cellules dendritiques et monocytes/macrophages possèdent un précurseur hématopoïétique commun dans la moelle osseuse: le MDP (pour Macrophages and Dendritic Cells Progenitor). La compréhension des mécanismes régissant l'orientation de la différenciation de ce progéniteur commun, comme de ceux spécifiques à l'une des populations, permettrait de moduler les cellules hématopoïétiques produites par les patients septiques afin d'améliorer leur état. Ceci pourrait permettre dans un premier temps de diminuer la phase d'inflammation mais aussi de diminuer l'immunosuppression compensatoire en favorisant la production des DC dans un second temps.

Notre premier objectif est de caractériser les modifications au niveau des cellules immunitaires spléniques induites dans notre modèle murin d'endotoxémie. Nous allons ensuite caractériser les modifications du nombre des précurseurs hématopoïétiques, de leur prolifération et de leur viabilité. Ceci sera fait dans la moelle osseuse, dans le sang mais aussi dans la rate, qui peut être un lieu d'hématopoïèse extra-médullaire en cas d'infection. Nous étudierons pour cela des souris C57BL/6 mais aussi des souris transgéniques afin d'étudier les mécanismes des phénomènes observés. Les expériences de ce projet impliqueront un maximum de 1560 souris, en appliquant quand cela est possible la règle des 3Rs (Remplacer (1), Réduire (2), Raffiner (2)). À ce jour, il n'est pas possible de remplacer les approches *in vivo* par des méthodes *in vitro* adaptées, car celles-ci ne permettent pas l'étude des mécanismes de l'inflammation dans des conditions physiologiques (1). Afin de réduire le nombre d'animaux avec une puissance statistique suffisante, des lots de 5 souris seront utilisés. Ce nombre est justifié sur la base d'expériences préliminaires montrant la variabilité entre les souris et associant la dispersion des valeurs individuelles intra-groupes et la puissance des tests statistiques de comparaisons intergroupes (2). Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse ainsi que l'impact environnemental, les animaux seront observés quotidiennement par des personnes formées et des points limites seront prévus. Nous prêterons attention aux signes externes, comme l'apparence physique, mais aussi le comportement et la réponse aux stimuli externes (3).

Nous espérons que notre projet apporte une meilleure compréhension des mécanismes de la différenciation des précurseurs hématopoïétiques en cas d'infection, et ceci pourrait permettre l'amélioration de la prise en charge des patients septiques.

16821 Les changements globaux actuels induisent des variations rapides de l'environnement auxquelles les individus doivent faire face sur une échelle de temps très réduite. Un des mécanismes possibles d'adaptation rapide est la plasticité phénotypique, dont une large part dépend des effets maternels. L'objectif de ce projet est de déterminer de quelle façon les effets maternels peuvent être influencés

par ces variations de l'environnement et s'ils peuvent moduler les réponses physiologiques et comportementales des individus et leurs conséquences sur les populations, en combinant des approches expérimentales, corrélatives et comparatives en populations naturelles de mésanges se reproduisant en habitats contrastés (rural vs urbain). Les données issues de ce projet à long terme permettront des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes écologiques d'adaptation aux modifications de l'environnement. Les enjeux sont d'une part fondamentale, car il est nécessaire de mieux connaître le déterminisme des caractéristiques individuelles pouvant être corrélées avec le succès des individus, et d'autre part appliqués, car ces caractéristiques reflètent les interactions de l'individu avec son milieu de vie : cette étude a aussi pour but d'apporter des éléments nouveaux permettant d'améliorer les mesures de gestion et de conservation des espèces protégées. Les retombées appliquées sont liées au développement de bio-indicateurs de la qualité de l'environnement et des risques environnementaux liés aux activités humaines, en particulier en ville.

Les espèces concernées par ce projet sont la mésange charbonnière *Parus major* et la mésange bleue *Cyanistes caeruleus*. Le projet repose sur le suivi de la reproduction en nichoirs, pour un effectif stable de 250 nichoirs en habitat forestier et 100 en habitat urbain, dont le taux d'occupation est variable chaque année, de même que l'abondance relative de chaque espèce. Les mésanges produisent de 6 à 14 oeufs, puis poussins, par couple et par ponte. La survie et le recrutement local des jeunes produits est en moyenne de 8% et varie entre 3 et 20% suivant les années et populations. La survie annuelle des adultes est ensuite d'environ 50%. Pour cette raison, il est nécessaire d'échantillonner un grand nombre de poussins pour être en mesure de relier les effets maternels (composition de l'oeuf) à la survie et à la reproduction future des jeunes produits, et comparer de façon robuste statistiquement les caractéristiques des jeunes qui ont survécu ou non.

On s'attend à obtenir un effectif de 1400 individus au total, ce chiffre correspond à la somme des effectifs prévisionnels maximums annuels, et est établi par rapport nombre maximal échantillonnés au cours d'une année depuis le début du projet, et est donc le plus proche ce qui est susceptible d'être atteint. C'est une estimation du nombre d'individus qui peut être capturé par an, dépendant du taux d'occupation des nichoirs et d'autres facteurs environnementaux, variable chaque année. Ce chiffre se décompose en 400 adultes et 1000 poussins au total sur les deux espèces, par an.

Le projet ayant pour objectif de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation à la variabilité environnementale dans les populations naturelles et leurs conséquences sur la dynamique de celles-ci, il n'est pas possible de ne pas utiliser de modèle animal sauvage. Le nombre de nichoirs installés (conditionnant le nombre d'individus manipulés) correspond au minimum nécessaire, étant donnée la variabilité inter-annuelle d'occupation, d'abondance relative des deux espèces, et de succès de la reproduction, pour obtenir des effectifs annuels suffisant pour conduire des analyses statistiques robustes, les effets que l'on étudie étant potentiellement subtils et/ou détectables en interaction avec des facteurs environnementaux ou phénologiques.

Le projet repose sur un suivi individuel au cours de la vie des oiseaux, une attention particulière est donc portée à minimiser le stress occasionné, et ainsi à minimiser l'impact sur leur survie et leur capacité de reproduction (nombre et qualité des poussins). Toute manipulation est interrompue et l'individu relâché immédiatement au point de capture en cas de signes de stress important.

16822 L'explosion des biothérapies est à l'origine d'une véritable révolution thérapeutique dans le domaine du cancer. Utilisées en immunothérapie cellulaire, les cellules CAR-T (cellules T à Récepteur Antigénique Chimérique) sont des lymphocytes T, prélevés au patient, puis modifiés génétiquement *in vitro* de manière à leur faire exprimer un récepteur artificiel, dit chimérique. Ce récepteur est conçu de telle manière que sa partie extra-cellulaire reconnaisse un antigène tumoral, le plus spécifiquement possible afin d'éviter les effets néfastes sur d'autres organes du patient. Dans le cas du traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique à cellules B (LAL-B), c'est une protéine qui cible le récepteur CD19 présent à la surface des lymphocytes B, les cellules à l'origine de la maladie. La partie intra-cellulaire va, elle, se charger de l'activation des lymphocytes après fixation sur les cellules leucémiques : elle se compose de plusieurs domaines d'activation et de co-activation. Ces constructions ont évolué avec le temps pour donner naissance à plusieurs « générations » de cellules CAR-T.

Cependant, la thérapie par cellules CAR-T se heurte à plusieurs problèmes majeurs. L'un des effets secondaires de la thérapie, qui est également un signe de l'efficacité thérapeutique, est un relargage massif de messagers chimiques dans le sang appelé « Syndrome de Relargage des Cytokines » (CRS) provoquant fatigue, fièvre, nausées et pouvant aller jusqu'à la chute de la pression sanguine, de l'arythmie cardiaque ou des troubles neurologiques. Bien que des traitements existent actuellement pour contrer cet effet, il apparaît nécessaire de développer de nouveaux modes d'administration pour sécuriser au mieux cette thérapie. L'autre problème majeur de l'utilisation des cellules CAR-T en thérapie est la persistance de ces cellules *in vivo*. Le fort effet anti-tumoral est suivi par une mort cellulaire importante liée à l'activation de ces cellules. C'est pourquoi il semble important au cours de cette thérapie de favoriser la persistance de ces cellules chez le receveur afin d'induire une mémoire immunitaire permettant une protection au long terme.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier dans un modèle de xenogreffe tumorale chez la souris (modèle murin de LAL-B) une nouvelle modalité d'administration des cellules CAR-T en fractionnant la dose pour l'injecter de manière séquentielle :

- i) A court terme, cette stratégie nous permettra d'évaluer l'effet anti-tumorale de notre traitement suivant la stratégie d'administration utilisée, d'identifier et de quantifier les messagers chimiques relargués par les cellules au moment de la thérapie et d'évaluer les possibles effets secondaires ainsi que la survie.

- ii) A plus long terme, nous étudierons la persistance de notre médicament (cellules CAR-T) à l'intérieur de la souris afin de déterminer si les cellules injectées restent présentes et actives dans l'organisme de la souris. Nous évaluerons par la suite cet effet protecteur en injectant à nouveau la même maladie pour en suivre son évolution.

Ce projet a été réfléchi et construit avec la volonté de mettre en place et de respecter la règle des 3R. Remplacer : le recours à l'expérimentation animale pour une validation sur un modèle souris est incontournable avant son utilisation en thérapeutique clinique. Le choix de la souris repose sur la connaissance du système immunitaire de cette espèce, sur l'abondance des outils d'analyse des réponses immunitaires à disposition et par sa proximité phylogénétique avec l'homme qui permet d'envisager la transposition en clinique des stratégies évaluées. Ce projet requiert ainsi l'utilisation d'un maximum 90 souris NSG sur une durée de 2 ans. Le raffinement est permis par l'utilisation de femelles, moins sujettes aux caractères dominants associés à des combats et des blessures, qui seront hébergées tout au long des expérimentations en portoir ventilé, à raison de 4 à 5 animaux par cage. Elles disposeront de nourriture et d'eau à volonté, ainsi que d'un enrichissement du milieu avec du coton (cell-nest) et d'un abri de cellulose. Les animaux seront anesthésiés et analgésiés lors de chaque procédure susceptible d'induire une souffrance et les éventuels points limites anticipés. Enfin, la réduction est permise par le choix d'effectif de souris basé sur des analyses statistiques optimisées ainsi que sur l'expérience de précédents protocoles analogues menés dans d'autres laboratoires avec lesquels nous collaborons.

Au final, l'étude de ces différentes approches d'administration de cellules CAR-T nous permettra de déterminer quelle est la méthode la plus sûre et d'améliorer ainsi le traitement par immunothérapie cellulaire de la leucémie.

16823 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un composé en développement, de type probiotique, destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité. Des données antérieures ont démontré la capacité du composé X à réduire le poids corporel de souris rendues obèses par une alimentation enrichie en graisse, cet effet étant rapide (effet mesurable après 2-3 jours de traitement) et prolongé (effet toujours mesurable après plusieurs semaines de traitement).

L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de ce composé sur la prise alimentaire chez des souris nourries par un régime standard ou un régime hyperlipidique (45% de l'énergie issue des graisses) pendant 3 semaines dans le cadre d'un protocole de renutrition après une période de mise à jeun. Le protocole de renutrition est un protocole classiquement employé afin d'étudier à court terme les effets d'un composé sur la prise alimentaire. Il consiste à mesurer la prise alimentaire des animaux

traités à l'aide du composé X ou du véhicule sur une durée déterminée suivant une période de jeun de 24h. En effet, la mise à jeun est connue pour induire un état d'hyperphagie réactionnelle chez le rongeur, ce qui constitue une situation expérimentale idéale pour mesurer finement les effets d'un composé anti-obésité sur la prise alimentaire.

Le traitement sera administré par voie orale pendant 23 jours, après une période d'acclimatation de 14 jours des animaux à notre animalerie. Le protocole de renutrition sera réalisé au 21ème jour de traitement.

La présente étude nécessitera l'emploi de 60 souris C57Bl/6 réparties en 6 groupes expérimentaux de 10 animaux.

La moitié des groupes (3 groupes de 10 animaux) sera nourri avec un régime standard alors que la seconde moitié sera nourrie avec une alimentation enrichie 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 individuelles afin de permettre la mesure de prise alimentaire journalière individuelle, mais les cages (transparentes) seront positionnées côte à côte de façon à maintenir un contact visuel entre les animaux et atténuer la sensation d'isolement. Par ailleurs, un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification ainsi que de briquettes de bois spécifiques pour rongeur. 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 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 la consommation alimentaire.

16824 Les syndromes d'hypoventilation centrale sont des pathologies qui résultent de désordres neurologiques affectant les structures nerveuses qui génèrent la commande respiratoire. Un de ces syndromes, le syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité (indice de masse corporelle, IMC supérieur à 30 kg/m²) est caractérisé par une hypoventilation diurne associée à une hypercapnie (le CO₂ n'est pas suffisamment éliminé) et un désordre respiratoire durant le sommeil, certains patients présentent des apnées et un inconfort respiratoire, la morbidité et mortalité sont accrues chez ces patients. L'hypoventilation n'est pas due à une maladie pulmonaire, à un trouble de la paroi thoracique (autre que la surcharge pondérale due à l'obésité), à une faiblesse musculaire ou un syndrome d'hypoventilation alvéolaire congénitale connu. Un dysfonctionnement de la communication portée par la leptine au niveau de la commande respiratoire semble sous-tendre le déficit respiratoire.

Notre unité de recherche est particulièrement intéressée par les syndromes d'hypoventilation centrale. Parmi les approches en développement actuellement chez l'humain dans notre unité, la stimulation transcutanée en courant continu semble apporter des résultats pertinents pour notre problématique. Cependant, peu de choses sont connues sur le plan mécanistique alors que cela permettrait de mieux comprendre mais aussi et surtout de mieux mettre à profit son utilisation notamment dans le cadre de syndromes d'hypoventilation centrale.

Nos objectifs sont doubles : 1/ corriger l'hypoventilation par une stimulation au niveau cervical chez un modèle de souris présentant une obésité associée à une hypoventilation 2/ déterminer les mécanismes impliqués dans les effets respiratoires de cette stimulation appliquée au niveau cervical afin de les mettre à profit pour la correction des troubles respiratoires.

Les approches utilisées seront des approches non réalisables chez l'Homme. L'utilisation de neurones isolés en culture cellulaire ne permet en effet pas d'appréhender les relations entre les différentes structures neuronales. Les expérimentations à réaliser permettront de mesurer les effets respiratoires et de les coupler à la caractérisation des mécanismes impliqués (régions encéphaliques, populations cellulaires et les systèmes de neurotransmission). Ces expérimentations seront menées suivant 4 procédures expérimentales chez les souris modèles du syndrome d'hypoventilation associé à l'obésité. Les effectifs visés doivent se situer entre 10 et 15 animaux par groupe de façon à mettre en œuvre un calcul de puissance afin d'ajuster au minimum l'effectif d'animaux nécessaire dans chacune des procédures expérimentales. Ainsi, les effectifs envisagés sont de 88 souris adultes. Lorsque cela sera possible, ce seront les mêmes animaux qui seront engagés dans l'analyse de la commande respiratoire et des réseaux neuronaux modulant la respiration et dans l'analyse des populations cellulaires impliquées. Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes *in vitro* ...) est préféré. Toutefois, vu la nature de nos recherches, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le design de nos expériences a été calculé au plus juste, en tenant compte de la puissance des analyses statistiques. Nous utiliserons 88 souris mâles adultes pour cette étude. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale sera mise en œuvre 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.

16825 L'épilepsie touche plus de 50 millions de personnes dans le monde. Les épilepsies focales sont parmi les plus fréquentes et sévères des épilepsies, conduisant parfois à une mort inattendue, nommée SUDEP ou MSIE en français (Mort Subite et Inexpliquée en Epilepsie). Il est nécessaire de comprendre les mécanismes à l'origine de ces crises afin de pouvoir développer de nouveaux médicaments antiépileptiques. Parmi les formes génétiques d'épilepsie focale, les mutations du gène *Depdc5* représentent à l'heure actuelle les mutations les plus fréquentes chez l'homme. Pour comprendre l'impact de ces mutations perte de fonction de *Depdc5*, nous avons généré plusieurs lignées de souris invalidées pour *Depdc5*, soit totalement (KO), soit conditionnellement (cKO). Nos procédures expérimentales incluent l'étude du phénotype épileptique et comportementale (comorbides à l'épilepsie) par électroencéphalographie (EEG) vigiles, l'électrocardiographie sur animal vigile ou anesthésié, pour caractériser l'émergence de SUDEP, et l'étude histologique et électrophysiologique du cortex dans le but de proposer un mécanisme d'épileptogénèse. Cela nous permettra ainsi d'envisager un traitement visant ces mécanismes, et de les tester sur nos modèles par l'administration par voie orale, IP ou intracérébrale d'agents antiépileptiques.

Nos études nécessitent l'utilisation d'animaux puisque: (1) Les modifications cérébrales conduisant à l'émergence de l'épilepsie ne peuvent pas être étudiées chez l'humain. (2) La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas certaines propriétés des crises d'épilepsie dans un cerveau entier tels que le site d'initiation et le patron de propagation des crises. (3) La modélisation *in silico* nécessite des données expérimentales encore manquantes. Les souris présentent de nombreux avantages: (1) La possibilité de reproduire l'anomalie génétique humaine grâce aux nouvelles techniques génétiques. (2) Les rongeurs ont un cerveau suffisamment complexe pour générer des crises d'épilepsie. (3) De nombreux modèles d'épilepsie ont été développés dans ces deux espèces permettant d'avoir accès à d'abondantes données. Nous estimons qu'un maximum de 2240 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Nos travaux seront réalisés dans l'application de la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner).

Afin de limiter au maximum l'utilisation des modèles animaux utilisés au cours de ce projet, la culture neuronale sera privilégiée dans certains aspects de nos travaux (remplacer). Nous ferons une planification rigoureuse des expériences en testant préalablement la faisabilité des expériences, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques comme le test de student (réduire). Enfin, un soin particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, de la douleur et du stress

des animaux grâce à l'utilisation combinée d'anesthésiques et de analgésiques, mais aussi de conditions d'hébergement adéquates et en milieu enrichi (raffiner)..

16826 Un arrêté du 12 mars 2015, du Ministère des Affaires Sociales, de la santé et des droits des Femmes, modifie le contenu de la formation des IBODE (infirmier de bloc opératoire diplômé d'état). Cette formation inclue les nouveaux actes et activités et concerne les IBODE déjà diplômés ainsi que les élèves IBODE. La formation des IBODE passe par un apprentissage technique sur le vivant non humain. En effet, les actes que les IBODE doivent pratiquer lors des interventions chirurgicales chez les humains doivent être parfaitement maîtrisés afin d'être capable d'aider le chirurgien si besoin est, le seul moyen d'acquérir cette maîtrise est de pratiquer sur les animaux. En effet, les IBODE doivent par exemple savoir suturer des organes, arrêter des hémorragies, pratiquer des gestes d'urgence... Il est donc impossible de remplacer cette formation par des méthodes *in vitro* ou *in silico*. Cette formation a débuté en 2016, nous formons 36 IBODE par session soit 108 pour 3 sessions par an. Nous avons besoin de pratiquer sur 36 porcelets par an soit 180 pour 5 ans sachant que pour limiter le nombre d'animaux utilisés, 3 IBODE pratiquent sur le même porcelet. Pour cette formation, nous utiliserons le porcelet landras de 50 kg environ. Ces porcelets proviennent d'un élevage agréé. Ils sont pris en charge de la même manière qu'un patient humain. Nous le tranquilisons avant de l'emmener au bloc opératoire pour lui éviter de stresser, puis nous le mettons sous anesthésie générale, avec une aide à la respiration. Nous contrôlons son rythme cardiaque, sa température. Nous lui injectons des antidouleurs, pour qu'il soit dans des conditions confortables et sans souffrance comme un humain au bloc opératoire. Tous les intervenants sont habillés comme au bloc opératoire humain (pyjama, charlotte, masque, gants, surchaussures). Les porcelets sont surveillés pendant toute la durée de l'intervention. Chaque injection de médicaments ou de prises de constantes sont notifiées sur sa fiche personnelle d'anesthésie. A la fin de l'intervention chirurgicale, les porcelets ne sont pas réveillés et sont euthanasiés par surdosage de pentobarbitale. Deux ateliers s'appuyant sur du matériel pédagogique sont organisés en complément de l'activité au bloc opératoire afin que les IBODE puissent être formés aux gestes qu'ils ou elles pourront rencontrer dans l'exercice de leur fonction. Cela permet de réduire le nombre de porcelets.

16827 Au cours des trois déménagements successifs du laboratoire, nous avons découvert que le réservoir d'azote liquide où l'on conserve nos cellules est contaminé par des mycoplasmes et des bactéries.

Nous avons 14 clones cellulaires produisant d'anticorps (Ac) dans un réservoir dont certains sont fragiles et un du grand intérêt médical.

Nous avons essayé de les mettre en culture avec tous les moyens de sauvegarde *in vitro* sans y parvenir. Il nous reste un ou deux tubes congelés pour chaque clone et une seule méthode pour les sauver qui consiste à passer les cellules directement dans la souris et les récupérer décontaminés des mycoplasmes et bactéries.

Le clone produisant l'Ac monoclonal d'intérêt médical reconnaisse un antigène exprimé par les thymocytes. Des résultats préliminaires montrent que cet Ac est capable de diminuer les paramètres pathologiques de la sclérose en plaque dans le modèle souris (voir annexe). Il peut être utilisé probablement, pour améliorer la situation des malades dans la sclérose en plaque et dans d'autres maladies auto-immunes car son cible est les lymphocytes T.

Pour cela, nous avons besoin de 33 souris Balb/C mâles reformés pour sauver nos cellules et produire le clone d'intérêt médical afin de les conserver par la suite. Les souris seront utilisées en respectant la règle de trois R. Réduire, Raffiner, Remplacer. Pour réduire, nous utiliserons Deux souris par clone, pour les 13 premiers clones, le minimum possible car on peut avoir une souris qui ne produit pas le clone. Pour raffiner, nous utiliserons toutes les moyennes permettant à respecter le bien être de l'animal. Toutes les procédures potentiellement douloureuses sont réalisées avec l'anesthésie et/ou l'analgésie appropriée, ou après euthanasie. De plus, des éléments (jeux) seront ajoutés aux cages pour conforter l'animal et enrichir son milieu. Pour remplacer, nous ne pouvons pas pour le moment utiliser autre méthodes *in vitro* car nous avons toutes essayé sans résultat. Par contre, nous utiliserons des animaux destinés à l'euthanasie (vieux mâles reformés) afin de ne pas produire d'autres animaux spécifiques pour ce projet. Les 7 autres souris seront destinées à sauver et à produire le clone d'intérêt

médical. C'est un clone très fragile et difficile à produire *in vitro* avec le risque de le perdre par le passage successif dans le milieu de culture. De plus, nous voulons confirmer nos résultats avant de passer à l'étape suivante afin de faire de lui un Ac recombinant thérapeutique.

16828 L'objectif de ce projet est de préparer des modèles d'atteintes physiologiques ou pathologiques chez le rat ou la souris. Ces modèles sont ensuite utilisés par différents établissements d'expérimentation, dans les domaines de la recherche fondamentale aux études précliniques afin de contribuer au développement de médicaments pour traiter un certain nombre de pathologies chez l'homme. L'utilisation de ces modèles physiologiques et pathologiques en recherche apporte les données préliminaires sur le comportement d'une molécule *in vivo* et apportent des informations sur le rôle de l'organe cible. Les modèles créés participent ainsi à l'étude des maladies liées à un dysfonctionnement physiologique, à tester l'efficacité de différents traitements médicamenteux et à valider la libération de lot de médicaments.

Dans le respect des 3Rs,

Remplacer : Les études précliniques sur rongeurs opérés permettent d'étudier les réactions d'organes ou de molécule en interaction avec l'organisme et les différentes réactions immunitaires, donc les traitements associés ne peuvent pas être remplacés par des études *in vitro*. Ces interactions ne sont pas des phénomènes isolés et par conséquent ne peuvent pas être étudiées *in vitro* sur un seul type de cellule.

Réduire : Basé sur les expériences précédentes le nombre d'animaux a été calculé le plus juste possible en fonction des chirurgies et permettant d'atteindre les objectifs scientifiques.

Raffiner : Les animaux utilisés seront hébergés dans un environnement adapté à l'espèce, au nombre et à l'âge, et dans un milieu enrichi et des points limites seront appliqués.

Les chirurgies sont réalisées selon des procédures standardisées et adaptées aux spécificités de souche, sexe, âge et poids.

Le contrôle de la douleur et le bien-être animal est une priorité : une injection d'un analgésique en péri-opératoire est réalisée en systématique. Toutes les interventions sont réalisées sur animaux anesthésiés, qui sont préalablement préparés de manière aseptique pour l'intervention. Les soins post-opératoires sont réalisés sur les animaux avec un suivi clinique et l'administration d'antidouleur. Les points limites sont définis en fonction des spécificités du modèle. Les animaux sont observés tous les jours

Le nombre d'animaux est estimé à 20 000 par an (soit 17 100 rats et 2 900 souris). Le projet étant prévu pour 5 ans, il est estimé 100 000 animaux (soit 85 500 rats et 14 500 souris) ce qui correspond au nombre total utilisé pour les différentes chirurgie d'exérèse comme l'ovariectomie, l'hépatectomie partielle, la splénectomie, la thymectomie, la néphrectomie ou néphrectomie 2/6, surrenalectomie, l'hypophysectomie...

16829 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 ;

4° mise à mort des animaux.

Notre projet est donc éducatif et requis par la loi. Il consiste à former les personnels désignés au 1 et 4 ci-dessus, à la pratique de procédures expérimentales faiblement invasives sur des souris.

Il s'agit d'initier ces personnels aux techniques suivantes :

- préhension, contention, manipulation adaptées aux différentes procédures de routine ;

- marquage individuel ;

- administration et prélèvements de routine ;
- anesthésie ;
- asepsie ;
- mise à mort

Les travaux pratiques, qui sont requis pour cette formation approuvée par le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, seront précédés de cours théoriques où des démonstrations sous forme de vidéos seront présentées et commentées, et les avantages et inconvénients de chaque méthode seront discutés.

De façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés pour ce projet, la compétence des personnels inscrits à la formation et ayant acquis les compétences décrites ci-dessus lors d'une expérience professionnelle antérieure sera évaluée ; les personnels jugés compétents seront exemptés de la formation à la pratique de procédures expérimentales faiblement invasives sur souris.

Il y aura 2 sessions de formation par an. Chaque session de formation impliquera l'utilisation de 75 souris maximum (nombre minimum nécessaire pour former les personnels concernés aux gestes envisagés, en respectant le bien-être animal), lesquelles seront des animaux issus de projets d'élevage autorisés dans l'établissement. Le projet utilisera un maximum de 750 souris sur 5 ans. Les gestes pratiqués sur les animaux seront de sévérité légère appliqués sur des animaux vigiles et sur des animaux anesthésiés dans une seule procédure.

Les animaux utilisés ne présenteront aucun signe de souffrance, nous nous engageons bien entendu à mettre à mort immédiatement tout animal qui montrerait pendant la session tout signe de détresse aigue (e.g. comportemental, respiratoire).

De façon à garantir la qualité de la formation, les formateurs seront des personnels choisis pour leur compétence dans la réalisation technique de chacune des procédures et leurs aptitudes pédagogiques, et un formateur encadrera au maximum 4 personnes.

16830 Les muscles squelettiques sont essentiels pour le maintien de la posture, la mise en mouvement du squelette, la respiration, la régulation du métabolisme. L'état du tissu musculaire est un facteur crucial dans les maladies comme par exemple les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, l'obésité ainsi que l'ensemble des myopathies. La fonction du muscle squelettique est également l'un des principaux facteurs néfastes pour la longévité et la qualité de vie des personnes âgées. En effet, au cours du vieillissement, la perte progressive de la masse musculaire squelettique, référencée sous le terme sarcopénie, est également associée à des troubles cardiovasculaires, métaboliques et cognitifs. Au niveau du tissu, le muscle squelettique est composé de fibres musculaires qui doivent s'adapter aux changements physiologiques et environnementaux tout au long de la vie. Il a la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches satellites. Les cellules satellites vont régénérer des fibres musculaires après une lésion, que celle-ci soit d'origine traumatique ou génétique (dystrophie musculaire). Des pathologies comme les myopathies, le vieillissement ou un exercice physique trop intense conduisent à un stade chronique d'activation de la régénération avec un épuisement des cellules satellites, aboutissant ainsi à une diminution de la capacité régénérative.

Les premières caractérisations d'un nouveau modèle murin semblent présenter un phénotype de vieillissement prématuré. Afin de mieux caractériser ce modèle au niveau moléculaire et histologique nous voulons étudier d'une part les régulations moléculaires au niveau du noyau musculaire dans des souris jeunes (2mois) et âgées (12 et 24 mois). D'autre part ce projet vise à évaluer la capacité des cellules satellites à restaurer le muscle présentant un phénotype de vieillissement prématuré. L'identification de capacités régénératrices pourrait permettre l'établissement de stratégies thérapeutiques afin d'améliorer la régénération musculaire au cours du vieillissement et dans des contextes pathologiques affectant le muscle.

Pour ce type d'étude sur le vieillissement dans le tissu musculaire le modèle animal reste l'unique moyen d'étude. En effet, du fait de la particularité du muscle squelettique et de l'impossibilité d'étudier le vieillissement en culture, ces études requièrent l'utilisation d'un modèle animal. Le modèle souris est

un modèle de choix en raison de ces étroites similitudes génétiques et physiologiques avec les humains. De récents travaux ont établi la souris comme un excellent modèle de vieillissement humain. Le nombre de souris a été évalué à maximum 924. Ce nombre a été calculé comme nécessaire et suffisant pour pouvoir valider statistiquement les résultats en prenant compte l'expérience acquise sur les techniques envisagées ainsi que l'exclusion d'animaux qui pourrait atteindre des points limites bien définis.

Une première procédure servira à produire les animaux nécessaires aux procédures 2 et 3 et comprend le modèle de vieillissement prématuré et les contrôles associés. Dans une deuxième procédure, des marqueurs moléculaires seront injectés dans un muscle sur souris anesthésiées dans le but d'évaluer la structure du tissu et les mécanismes moléculaires au cours du vieillissement. Dans une troisième procédure, une lésion musculaire locale sera réalisée après injection d'une toxine dans le muscle de la patte chez la souris anesthésiée afin d'évaluer la capacité des cellules satellites, qui sont non transgéniques, à restaurer un muscle présentant un phénotype de vieillissement prématuré. D'après des études antérieures et notre expérience, les animaux présentent un comportement et une activité normale après ces procédures dès leur réveil. Autant que possible, des prélèvements multiples seront réalisés après mise à mort sur le même individu pour des tests parallèles (intra et inter-projets).

Pour s'assurer du bien-être animal, les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Des anesthésiques sont utilisés pendant les expérimentations afin de réduire au maximum le stress et la souffrance des animaux. Les animaux seront toujours à plusieurs par cage afin de maintenir l'aspect social et chaque cage sera dotée d'un environnement enrichi (standard à l'animalerie), avec eau et nourriture ad libitum. Le bien-être des animaux sera évalué tout au long de la procédure par observation du comportement des animaux (posture, interaction) et mesure du poids.

16831 Le diabète représente un enjeu majeur de santé publique dont l'importance ne cesse de s'accroître. Ainsi l'incidence des deux formes de diabète est en augmentation constante : celle de l'incidence du diabète de type II ou d'insulinorésistance suite à l'augmentation des personnes en surpoids, et celle du diabète de type I dit insulinodépendant, concernant notamment les enfants, en raison de facteurs peu compris. Bien que comprise de manière incomplète, la physiopathologie des deux formes de diabète met en jeu des mécanismes clefs distincts. Dans le diabète de type I, le système immunitaire attaque et détruit l'organe producteur d'insuline dans une réponse auto-immune. En revanche, une demande métabolique excessive d'insuline, en partie due au développement d'une insulinorésistance de l'organisme en surpoids, épuise et dépasse la capacité de production d'insuline des cellules bêta.

Ce projet porte sur l'étude d'un modèle de souris invalidée pour une protéase, connue pour sa capacité à dégrader l'insuline ainsi que d'autres protéines comme l'amyloloïde bêta, qui pourrait éclaircir certains aspects de la physiopathologie des deux types de diabète et potentiellement mener à la découverte de pistes thérapeutiques notamment pour le diabète de type I. Selon des données de la littérature, cette souris présente certaines caractéristiques associées au diabète de type II, notamment une tolérance compromise au glucose administré per os dont les causes restent à élucider, cependant sans développer un diabète de type II. La souris non-obèse diabétique (NOD) développe un diabète auto-immun spontané partageant de nombreuses caractéristiques avec le diabète de type I humain, y compris le rôle critique de l'insuline comme cible pour les cellules du système immunitaire qui détruisent les cellules bêta. Selon nos résultats préliminaires, l'absence de cette protéase protège la souris NOD du diabète, et semble modifier la réponse immunitaire vis-à-vis de l'insuline. En même temps, nous constatons que l'absence de cette protéase semble stimuler une réponse de type « stress protéotoxique » au sein des cellules bêta ainsi que leur prolifération accrue. Le « stress protéotoxique » fait partie de la vie physiologique des cellules bêta, qui doivent être en mesure de produire et sécréter de très grandes quantités d'insuline rapidement ce qui leur impose ce type de stress. Pour ceci, ces cellules mobilisent une voie physiologique qui est critique pour la production de l'insuline et pour la survie des cellules bêta. Un rôle protecteur pour les cellules bêta d'une réponse modérée à un stress protéotoxique est déjà décrit dans la littérature. Postulant que cette réponse est renforcée dans les cellules bêta dépourvues de la protéase étudiée, nous souhaitons comprendre le mécanisme de ce renforcement, pour in fine identifier des cibles thérapeutiques qui pourraient protéger l'homme contre le diabète auto-immun.

Les objectifs du projet sont donc les suivants :

-Avant tout nous souhaitons comprendre de quelle manière l'absence de la protéase étudiée protège du diabète auto-immun (de type I).

-Émettant l'hypothèse que la stimulation de la réponse au stress contribue à cette protection, nous souhaitons analyser cette réponse ainsi que son lien avec la réponse auto-immune en détail.

-Enfin nous examinerons le rôle de l'expression de la protéase dans les cellules bêta versus l'ensemble de l'organisme, ainsi que celui de son activité enzymatique

Nous appliquerons la règle des 3R dans l'ensemble du projet :

Réduire : -Le projet étant originel, le risque de répétition d'expériences est faible.

-Nous utiliserons des calculs de puissance dans le planning des expériences et pendant leur suivi afin de limiter le nombre d'animaux au minimum pour obtenir des résultats statistiquement concluants, tenant compte des données scientifiques publiées ou obtenues par nos études *in vitro*, du type et du nombre simultané de données collectées et de l'expérience des expérimentateurs. Les résultats avec une valeur $p \leq 0,05$ seront considérés comme significatifs.

-Nous partagerons les souris avec les autres chercheurs du groupe et de l'institut utilisant des approches et prélèvements distincts afin de tirer un maximum d'informations de chaque animal mis à mort

Raffiner : -Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris, notamment en utilisant systématiquement l'anesthésie et l'analgésie pendant les procédures invasives.

-Suite aux et pendant les traitements, nous surveillerons quotidiennement l'état général, le poids, l'apparence et le comportement des animaux. L'expérimentation sera ainsi interrompue avant le développement de complications aiguës pouvant causer une douleur à l'animal.

Remplacer

-L'utilisation du modèle de la souris NOD, par ailleurs un très bon modèle du diabète de type I humain, est incontournable pour ce projet car le diabète auto-immun résulte de l'interaction complexe entre le système immunitaire et l'organe cible de la réponse auto-immune, ceci dans le contexte de la régulation du métabolisme par les cellules bêta. Il est impossible d'étudier ces interactions *in vitro*, même dans les systèmes les plus avancés disponibles, tels que les organoïdes.

Globalement nous espérons que notre projet mettra en lumière une voie physiologique, régulée par la protéase, qui a le potentiel de protéger les cellules bêta du diabète auto-immun, et dont l'exploration pourrait révéler de nouvelles cibles pour des interventions prophylactiques et thérapeutiques dans le diabète insulino-dépendant. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 1286.

16832 Chez le cheval, l'administration d'antibiotiques peut être à l'origine de perturbations du microbiote du gros intestin (dysbiose) et provoquer l'apparition de maladies digestives potentiellement létales pour l'animal. En effet, la prévalence des diarrhées et colites associées aux antibiotiques est de 22 à 94 % selon les études. L'utilisation de probiotiques (micro-organismes vivants, qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé au-delà des effets nutritionnels traditionnels, OMS), semble être une stratégie prometteuse pour limiter les risques de dysbiose et d'inflammation lors d'une antibiothérapie.

Un premier essai conduit en 2018 a montré que la supplémentation avec un complément alimentaire contenant un mélange de trois souches bactériennes pouvait participer au maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale de chevaux lors d'une antibiothérapie. En vue d'obtenir une allégation « additif zootechnique » par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), l'efficacité de ce complément alimentaire doit être confirmée par d'autres études *in vivo* (Règlement (CE) No 1831/2003). La présente étude visera à déterminer l'impact d'une supplémentation avec le complément alimentaire déjà testé en 2018 sur l'écosystème du gros intestin et la réponse inflammatoire du cheval soumis à un stress antibiotique. L'application de ce règlement européen ne permet pas, dans cette étude, de remplacer les chevaux par une autre espèce ou par un essai *in vitro*.

Les chevaux inclus dans l'étude sont huit hongres trotteurs français répartis en deux groupes homogènes de quatre individus. L'étude est composée de deux périodes identiques de 41 jours

chacune, séparées par deux semaines de repos. Au début de chaque période les chevaux reçoivent un antibiotique pendant cinq jours (durée normale du traitement). Un groupe de chevaux recevra le complément alimentaire pendant la première période et l'autre groupe pendant la deuxième période. Dans ce schéma expérimental, chaque cheval est son propre témoin puisque chaque lot est soumis à une antibiothérapie avec ou sans supplémentation en probiotiques. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en ayant la puissance statistique nécessaire à l'étude. En effet, les chevaux 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.

Les prélèvements nécessaires à l'évaluation des modifications des paramètres de l'écosystème microbien fécal et de l'inflammation ont lieu avant de commencer l'antibiothérapie, deux jours, cinq jours et sept jours après puis une fois par semaine. Ils sont donc au nombre de huit par période. Ils consistent en une fouille rectale pour obtenir des fèces et en un prélèvement sanguin réalisé via la veine jugulaire. Durant les 97 jours de l'essai, seize prélèvements fécaux et sanguins sont donc réalisés par cheval. Dans une optique de raffinement ces manipulations sont effectuées dans un travail adapté à la contention des chevaux pour éviter tout risque de blessure. De plus, pendant les périodes expérimentales les chevaux vont au paddock en groupe et sont exercés quotidiennement au marcheur. Durant les périodes de repos, les chevaux vont au pré en groupe. 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.

16833 Certaines molécules actives, telles que celles ciblant certains nerfs, nécessitent d'être administrées à proximité de la zone ciblée afin d'assurer une efficacité optimale et de limiter les effets secondaires. Leurs effets pharmacologiques et leur tolérance peuvent alors varier en fonction de la voie d'administration et de la localisation de l'injection.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité pharmacologique et le risque d'apparition d'effets secondaires de nos molécules actives chez le rat suivant différentes voies d'administrations (sous-cutanée, intradermique, périmerveuse, intrathécale) et dans différentes localisations anatomiques (membre antérieur, postérieur, dos, ...), sélectionnées en fonction des potentielles indications thérapeutiques. Pour cela, nous disposons d'un outil permettant ces mesures en limitant la durée de l'expérience : il s'agit d'une technique d'immunohistochimie qui met en évidence des modifications protéiques survenant de manière précoce suite à l'action de nos molécules actives. La localisation tissulaire et cellulaire de l'évènement permet d'évaluer les potentiels effets désirables et indésirables. Cette étude ne peut se faire que sur un organisme complet car les techniques *in vitro* et *ex vivo* ne permettent pas d'évaluer différentes voies et sites d'administration, et leur impact au niveau tissulaire. L'outil utilisé a été optimisé pour avoir une très bonne sensibilité (détection d'un petit nombre d'évènements) et spécificité (ne met en évidence que le phénomène que nous voulons suivre), ce qui autorise l'utilisation d'un petit nombre d'animaux par groupe (2 à 6) tout en garantissant des résultats fiables.

Toutes les injections se feront sous anesthésie générale et un analgésique local sera utilisé pour l'injection intrathécale pour éliminer la douleur liée à l'injection.

Les molécules sont choisies grâce à des expériences *in vitro* afin de retenir les propriétés les plus intéressantes. Les doses à administrer sont ensuite évaluées dans des études de tolérance afin de sélectionner des doses n'induisant pas d'effets adverses pour les animaux.

Le projet est divisé en deux étapes : une première visant à étudier une molécule active de référence interne afin de valider l'approche et de sélectionner les voies d'administration les plus pertinentes. Ceci limitera le nombre d'animaux nécessaire pour la deuxième étape, qui consistera à évaluer plusieurs nouvelles molécules actives. L'état de santé des animaux est suivi tout au long du projet et évalué grâce à l'utilisation d'une grille de points limites spécifiques.

Le nombre maximum d'animaux prévus pour ce projet d'une durée de 5 ans est de 1021 rats et pourra être diminué en fonction des résultats de la première étape du projet.

16834 La radiothérapie est considérée comme le deuxième traitement anti-cancéreux après la chirurgie. Outre ses effets cytotoxiques directs sur les cellules tumorales, la radiothérapie peut induire l'activation du système immunitaire provoquant ainsi une réponse inflammatoire anti-tumorale. Il a été montré récemment, que la radiothérapie est en mesure d'induire l'activation des lymphocytes T cytotoxiques pouvant éliminer les cellules tumorales. A cela s'ajoutent les effets des immunomodulateurs comme les inhibiteurs de PDL1 et de CTLA4 sur la réponse tumorale. PDL1 et CTLA4 sont des protéines membranaires (récepteurs) exprimées à la surface des lymphocytes T. L'activation de ces deux récepteurs par leurs ligands respectifs induit l'inhibition de l'activation des Lymphocytes T. En effet, il a été démontré que les inhibiteurs de PDL1 et de CTLA4 agissent en levant l'inhibition de l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. Ces derniers étant activés, ils peuvent éliminer les cellules tumorales. Il est maintenant établi que l'association de la radiothérapie avec de tels immunomodulateurs peut favoriser la réponse anti-tumorale. De nombreuses études précliniques et cliniques en cours montrent l'intérêt de cette association. Cependant, dans certains modèles précliniques mais aussi chez certains patients la combinaison radiothérapie et immunomodulateurs ne semble pas être très efficace dans l'éradication de la tumeur. Des études précliniques récentes montrent que la dose d'irradiation, que ce soit en dose unique ou en fractionnée, joue un rôle primordial dans l'efficacité des immunomodulateurs dans la réponse anti-tumorale. Il est donc nécessaire de développer des études afin d'optimiser l'efficacité de cette association radiothérapie/immunomodulateurs en évaluant plusieurs doses de radiothérapie en association soit avec des immunomodulateurs déjà validés comme les anti-PDL1/CTLA4 ou en évaluant d'autres molécules qui pourraient être impliquées dans l'activation du système immunitaire. C'est pourquoi nous allons évaluer l'effet thérapeutique de l'inhibiteur de CD73 en association avec la radiothérapie et avec les inhibiteurs de PDL1 et CTLA4. Le CD73 a été récemment identifié comme l'un des mécanismes d'immunosuppression adoptés par la tumeur. En effet, CD73 est impliqué dans la suppression de l'activation des lymphocytes T. Il est donc intéressant d'évaluer cette combinaison CD73/radiothérapie.

Malgré une avancée majeure dans le domaine de la radiothérapie avec le développement de nouvelles techniques, la radiothérapie reste toujours la cause du développement d'effets secondaires toxiques (telle que la fibrose) au niveau des tissus sains qui entourent la tumeur. Le développement de la fibrose radio-induite peut causer l'arrêt de fonction de l'organe touché tels que le cœur et les poumons. En effet, les données cliniques montrent que les patients guéris de leurs cancers développent à long terme une fibrose au niveau du site ayant reçu la radiothérapie et dans la plupart des cas ses patients décèdent suite aux complications causées par la fibrose (ex: insuffisance respiratoire dans le cas de la fibrose pulmonaire ou insuffisance cardiaque dans le cas de la fibrose cardiaque). Des études récentes montrent que les cellules immunitaires en particulier les macrophages jouent un rôle important dans le processus fibrogénique et il a été montré que l'inhibition de CD73 impacte l'activation des macrophages. Ceci est la raison pour laquelle nous allons évaluer l'effet thérapeutique de CD73 seul ou en combinaison avec les inhibiteurs de PDL1 et de CTLA4 dans le développement de la fibrose radio-induite dans les poumons (dans le but de tenter de diminuer l'effet secondaire fibrotique).

Ce projet a pour but d'évaluer l'effet thérapeutique d'immunomodulateurs combinés à la radiothérapie sur la réponse tumorale, dans le système complexe exposé ci-dessus. Ceci exige donc un système immunitaire dynamique complet (composé de toutes les cellules immunitaires) en interaction directe avec le stroma tumoral. L'étude du recrutement et de la réponse des cellules immunitaires dans la tumeur ainsi que leurs interactions complexes nécessite absolument le recours à un modèle animal vivant entier.

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'injection des cellules tumorales dans le poumon et la babine ainsi que l'irradiation des tumeurs (au niveau des poumons) sera faite sous anesthésie générale de la souris et sous anesthésie locale pour l'injection des cellules tumorales en sous-cutanée afin de réduire au minimum le stress, l'anxiété et la souffrance des animaux. L'injection des anticorps en intra-péritonéale sera également pratiquée sous anesthésie locale. Le suivi de la croissance

tumorale à l'IVIS (imagerie par bioluminescence) sera réalisé sous anesthésie générale des souris afin de réduire au minimum leur angoisse, leur souffrance et leur stress.

L'induction de fibrose par des rayonnements ionisants sera pratiquée sous anesthésie générale afin de réduire au minimum la souffrance et l'angoisse des animaux.

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 a 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 1661 souris.

16835 La sarcopénie est définie comme la perte de la masse et des fonctions musculaires liée à l'âge. Une moindre capacité anabolique musculaire (gain protéique) et une augmentation des anomalies métaboliques liées à l'âge (insulino-résistance...) participent à ce phénomène. Malgré les conséquences importantes sur l'autonomie du sujet âgé, aucune piste thérapeutique n'est envisagée. La vitamine D (VitD) pourrait améliorer les capacités mécano-métaboliques musculaires chez l'individu âgé. En effet, il a été démontré qu'une carence en VitD était toujours associée à une diminution de la masse, de la force et des capacités contractiles musculaires chez la personne jeune ou âgée aboutissant à une réduction des capacités physiques et à une augmentation du risque de chute et de fracture. A l'inverse, une supplémentation en VitD chez le sujet âgé, améliore significativement les paramètres fonctionnels musculaires. Même si une étude humaine a montré que l'expression du récepteur à la VitD (VDR) dans la cellule musculaire diminuait avec l'âge, très peu d'indications existent sur le rôle métabolique et moléculaire de ce micronutriment dans le muscle et l'impact du vieillissement sur celui-ci. L'objectif général de ce projet est de rechercher l'effet de la VitD sur les voies participant à la régulation de la masse et des fonctions musculaires et notamment le niveau de synthèse protéique. Ce projet permettra d'améliorer nos connaissances concernant l'effet de la VitD sur le métabolisme musculaire ainsi que son intérêt potentiel dans le traitement des pertes de masse et fonction musculaires liées à l'âge.

Afin de mettre en évidence les niveaux d'implication de la carence en VitD et/ou de la diminution du VDR musculaire dans la réduction de l'anabolisme protéique musculaire au cours du vieillissement, l'utilisation d'un modèle de souris invalidé pour le gène codant pour le VDR (KO VDR) uniquement dans le muscle squelettique (pour n'étudier que l'effet propre à ce tissu) est particulièrement intéressante. Des études précédentes ont montré que le VDR aurait un rôle important dans le développement et la taille de la fibre musculaire. Par conséquent, et étant donné que nous nous intéressons au vieillissement, l'invalidation du gène VDR ne doit pas perturber la phase de croissance de l'animal : elle doit donc être inductible dans le temps et pouvoir être induite après la phase de croissance. Ce modèle a été créé au sein de notre animalerie. Mais, avant de pouvoir utiliser cette souris KO VDR inductible muscle squelettique spécifique, une phase de mise au point sera nécessaire. En effet, l'induction de ce génotype se fait par administration d'une molécule chimique. Le temps nécessaire d'administration de cette molécule ainsi que la période pendant laquelle l'induction du génotype reste effective après administration sont inconnus pour ce modèle. Le nombre de souris nécessaire à cette phase de mise au point ne peut pas être donné précisément mais est estimé au maximum à 60.

En se basant sur cette phase de mise au point, l'effet de la suppression de l'expression du VDR sur le long terme sera étudié chez la souris âgée mâle de 15 mois sur une période de 3, 6 et 9 mois. La caractérisation du modèle nécessitera l'utilisation de 108 animaux : 54 souris témoins et 54 souris KOVDR muscle spécifique induites mises à mort 3, 6 et 9 mois après le début de l'induction du génotype. Avant la mise à mort des animaux, nous mesurerons systématiquement des paramètres anthropométriques (poids, masse grasse, masse maigre...) et des paramètres fonctionnels musculaires (force, mobilité spontanée des animaux...). Des mesures de synthèse protéique musculaire seront également réalisées sur chaque groupe d'animaux.

Pour la phase de mise au point et la phase de caractérisation de l'effet de la suppression du VDR dans le muscle au cours du vieillissement, nous utiliserons au total un maximum de 168 animaux. Toutefois,

pour obtenir ces 168 souris avec le bon génotype, le sexe souhaité (mâle) et l'âge requis (24 mois pour certaines souris), il faudra générer environ 1000 animaux au cours des 5 ans que dure le projet. L'ensemble du projet comporte 6 procédures dont le degré de gravité va de modéré pour 1 d'entre elles à sans réveil pour la dernière.

Un maximum de mesures seront prises afin de respecter la règle des 3R (raffiner, réduire et remplacer). Ainsi le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum tout en permettant d'effectuer des statistiques fiables avec une puissance suffisante. Des points limites précis sont proposés pour réduire la souffrance des animaux s'il y a lieu. Un modèle cellulaire de remplacement ne peut être utilisé dans ce projet car (1) des paramètres fonctionnels doivent être mesurés (locomotion, force...), (2) l'aspect "vieillesse" ne pourrait pas être abordé et (3) les cellules musculaires en culture présentent un métabolisme de la vitamine D perturbé et modifié par rapport à celui de l'homme.

16836 Les licences professionnelles spécialisées en culture cellulaire ont pour objectifs de former des personnels techniques de niveau A (anciennement niveau 2) tel que des assistants ingénieurs ou des techniciens supérieurs.

Les travaux pratiques d'immunologie cellulaire permettent de former les étudiants de cette filière au prélèvement d'organe dans des conditions d'asepsie, à la culture primaire de leucocytes (lymphocytes et macrophages) et de suivre par différents tests l'activation, la prolifération et la différenciation lymphocytaire. De plus, les techniques de manipulation des souris et d'injection seront mises en pratique dans le cadre de l'immunisation des souris afin de produire des anticorps monoclonaux. Ces anticorps monoclonaux seront produits par culture *in vitro* d'hybridomes (cellules sécrétrices d'anticorps), ce qui permet de présenter une technique alternative à la production d'anticorps monoclonaux *in vivo*.

Ce projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacement : Il est encore nécessaire d'avoir recours à des animaux dans le domaine de l'immunologie qui fait intervenir un grand nombre de types de cellules différentes et qu'il n'est pas possible de mimer *in vitro*.

Réduction : Le nombre des animaux a été réduit à son minimum en considérant un nombre d'animaux suffisant pour permettre à chaque étudiant de pouvoir acquérir les bons gestes de manipulation les animaux (1 souris par binôme) et d'avoir la quantité de cellules immunitaires suffisante à l'expérimentation.

Raffinement : De façon à prévenir le stress et l'angoisse des animaux, la taille des groupes de travaux pratique sera réduite à 8 personnes. Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales avec de l'enrichissement (frisottis de carton) et bénéficieront d'un suivi quotidien de leur état général. Ce protocole a été adapté afin de diminuer le nombre d'immunisation et la quantité d'adjuvant injecté afin de limiter l'inconfort et la douleur des animaux. Des points limites ont été identifiés et tout animal présentant une dégradation de son état général au-delà de ces points limites sera retiré de l'étude. L'ensemble des personnels (enseignants, techniciens et animaliers) intervenant sur les souris dispose d'une formation et d'une qualification adéquate à l'expérimentation animale. Enfin, au cours de ce projet, les étudiants seront formés par les enseignants à la manipulation des animaux et seront sensibilisés au bien-être des animaux.

Au maximum, 16 étudiants sont formés chaque année ce qui impliquera l'utilisation de 24 souris maximum par an soit un maximum de 120 souris Balb/c sur 5 ans.

16837 Les traumatismes graves sont la première cause de décès dans le monde des sujets jeunes. Les deux principales causes de décès sont le traumatisme crânien grave (TCG) et le choc hémorragique (CH). La mortalité précoce liée au TCG, définie comme celle des 24 premières heures, est estimée à 30%. Quant à la morbidité à long terme des survivants, elle est considérable avec des séquelles lourdes et invalidantes, responsables, en plus du drame humain, de coûts économiques importants chiffrés en milliards d'euros.

Le CH est caractérisé par une perte brutale de sang qui compromet l'apport en nutriments et en oxygène aux organes. Isolé, il entraîne 30% de décès dont la moitié surviennent dans les 2 heures de prise en charge.

La conjonction du TCG et du CH entraîne une potentialisation physiopathologique qui rend la réanimation initiale complexe, avec des objectifs parfois contradictoires (par exemple maintenir une pression de perfusion cérébrale satisfaisante d'une part et limiter le niveau de pression artérielle pour contrôler le saignement d'autre part), et grève d'autant plus le pronostic de ces patients dont la mortalité des 6 premières heures est effroyable.

La prise en charge initiale des patients ayant subi un TCG repose sur des paramètres physiologiques simples, en particulier le contrôle étroit de la pression intracrânienne (PIC). L'objectif principal est d'assurer le maintien d'une pression de perfusion cérébrale (PPC) comprise entre 60 et 70 mmHg (la PPC est définie comme la différence entre la pression artérielle moyenne (PAM) et la PIC)) afin d'éviter une souffrance ischémique secondaire susceptible d'aggraver le pronostic initial. Cependant, cet objectif seul peut avoir pour conséquences d'ignorer l'établissement de lésions secondaires et être incapable d'individualiser une stratégie thérapeutique.

Plusieurs facteurs contribuent à expliquer la relative mais persistante pauvreté des objectifs de la neuro-réanimation. Un déterminant majeur est l'absence de modélisation de l'homéostasie cérébrale avant et après le TCG, chez un animal présentant des caractéristiques morphologiques et physiologiques proches de celle de l'homme. Compte tenu des contraintes des études cliniques et de notre incapacité à simuler un état de choc hémorragique et de traumatisme crânien chez l'Humain, des expérimentations animales dans un modèle permettant de décrire le plus systématiquement possible les modifications physiologiques liées à la survenue d'un TCG éventuellement associé à un CH concomitant, sont indispensables pour accélérer une amélioration de la prise en charge des patients dont le pronostic vital et/ou fonctionnel est à l'heure actuelle effroyable.

Ainsi un modèle animal structuré, robuste, et mêlant l'ensemble des outils du multi-monitorage actuellement utilisé en pratique clinique permettrait de développer plusieurs axes majeurs de connaissances, dans le but de réaliser des études précliniques potentiellement plus applicables à l'homme :

- la cinétique d'installation des troubles de l'homéostasie cérébrale après la survenue du TCG, pour pouvoir évaluer la pertinence des paramètres de monitoring dans les objectifs de la réanimation précoce.

- la relation temporelle entre les différentes altérations des paramètres de l'homéostasie cérébrale, qui ne sont pour le moment que très imparfaitement connues.

- la relation entre les troubles de l'homéostasie cérébrale et la survenue d'une modification du profil inflammatoire au niveau cérébral et périphérique, qui est constamment associée à la survenue du TCG.

- la possible détermination de profils d'altération de l'homéostasie cérébrale pouvant permettre de catégoriser les traumatismes crâniens et ainsi d'espérer adapter les thérapeutiques existantes, à l'image de ce qui a déjà été réalisé dans d'autres pathologies de réanimation, le syndrome de détresse respiratoire et le choc septique.

L'objectif de ce modèle est également de pouvoir fournir un socle méthodologique réutilisable pour des équipes cherchant à développer des outils d'analyse avancée du monitoring et/ou des thérapeutiques innovantes dans des essais précliniques, comme ont été développés les modèles animaux de rongeurs.

Notre projet est divisé en deux parties. Une première partie porte sur le développement et la caractérisation exhaustive d'un modèle porcin de TCG, isolé et associé à un CH réanimé sur les 24 premières heures de la prise en charge. Une deuxième partie profite des résultats de la première partie pour évaluer l'efficacité thérapeutique de différentes stratégies de réanimation.

L'ensemble du projet nécessite 132 porcs, maximum, sur une durée de 5 ans.

Afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse intermédiaire sera réalisée après l'inclusion de 6 animaux par groupe pour vérifier la distribution des variables et statuer sur le nombre à affiner. La deuxième partie ne sera réalisée que si le modèle est validé à la fin de la première partie.

L'ensemble de cette procédure sera réalisé sous anesthésie générale par un mélange couvrant les composantes hypnotiques et antalgiques de l'anesthésie, et nous avons décidé de ne pas réveiller les animaux en fin d'expérimentation, à ce stade de nos connaissances.

Nous utiliserons dans cette étude au maximum 132 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 fouissement encouragée, médecine ball, jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif...).

16838 L'état de stress post-traumatique (ou PTSD de l'anglais post-traumatic stress disorder) est un trouble sévère lié au stress se développant chez environ 25% des individus confrontés à une situation de stress intense vécue comme traumatisante (un attentat, une agression ou encore des combats militaires). Les bases neurobiologiques de l'altération mnésique propre à l'état de stress post-traumatique restent aujourd'hui encore peu connues. Cet état est caractérisé par une altération qualitative de la mémoire impliquant simultanément une hypermnésie (souvenirs excessifs de certains événements) et une amnésie (oubli du contexte). Il a été montré dans un modèle animal que la mémoire de peur contextuelle normale dépend de l'activation d'une voie de signalisation liée aux récepteurs des glucocorticoïdes (GR) dans l'hippocampe. Plus récemment, une équipe de recherche a montré qu'une mémoire de type PTSD résulte d'une dérégulation de cette même voie de signalisation. Ce projet a donc pour objectif d'étudier les conséquences neurobiologiques qui découlent de ces altérations, susceptibles de sous-tendre le passage d'une mémoire émotionnelle normale à une mémoire de type traumatique. Ainsi, en identifiant les bases neurobiologiques spécifiques de la mémoire traumatique, ce projet doit ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de ce trouble anxieux. Cette étude sollicite un modèle comportemental développé et validé qui permet de modéliser chez la souris l'altération qualitative de la mémoire observée chez des patients atteints de stress post-traumatique. Ce projet nécessite l'utilisation de 430 souris de souche C57Bl/6J, 30 de souche CD1 SWISS et 270 souris transgéniques. L'utilisation de ces animaux et donc l'impossibilité de Remplacer 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 mnésiques.

2) L'organisation du système nerveux central de cette espèce est assez proche de celle de l'Homme, ce qui permet une extrapolation acceptable des résultats obtenus chez ces espèces à l'espèce humaine.

3) Le modèle comportemental a été établi chez la souris et les appareils comportementaux et procédures sont adaptés pour cette espèce.

Afin de Raffiner notre expérimentation, la réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés et diverses mesures seront prises : choix d'un modèle approprié, surveillance quotidienne et raffinement des conditions d'élevage et d'hébergement, planification des protocoles en vue d'éviter le stress des animaux, utilisation d'anesthésiques, établissement de points limites... Enfin dans un souci de Réduction, nous validerons nos hypothèses quand cela est possible en utilisant un modèle *in vitro* de cellules PC-12 issues d'un phéochromocytome (tumeur neuro-endocrinienne) de médullosurrénale ou de cultures primaires de neurones hippocampiques. Quand l'utilisation de modèle *in vitro* ne sera pas possible, par exemple pour étudier un profil mnésique de type PTSD, nous utiliserons le nombre minimum d'animaux qui nous permet d'avoir un pouvoir statistique suffisant afin de valider nos hypothèses.

16839 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 ciblée seront tuées, sans affecter le reste du microbiote.

Les bactéries d'intérêt 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 but de cette étude est de vérifier la stabilité du traitement et de s'assurer de sa bonne biodistribution dans le système digestif avant la phase d'efficacité sur lapereaux infectés.

18 lapereaux seront utilisés pour 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 : Le traitement sera testé sous 2 formes et sa libération dans le système digestif des lapereaux sera évaluée à 3 temps différents. Ainsi 6 conditions distinctes sont à évaluer. Seulement 3 lapereaux par groupe seront nécessaires afin de permettre une comparaison statistique fiable entre les groupes. Un même animal permettra de récolter plusieurs informations sur plusieurs organes du système digestif, limitant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner : Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et enrichi. Les lapereaux et leur mère ne seront pas séparés durant l'étude pour limiter leur stress et permettre une alimentation naturelle par la tétée. L'administration du traitement sera réalisée par voie orale et sera donc indolore. Des critères d'arrêts de l'étude ont été définis afin d'assurer le bien-être des animaux.

16840 L'arthrite est une maladie inflammatoire fréquente dans la population, très invalidante qui se traduit par un gonflement de l'articulation et des douleurs chroniques. Au cours du processus inflammatoire, on observe aussi une forte réorganisation du réseau des fibres nerveuses, des vaisseaux sanguins et des cellules immunitaires au niveau de l'articulation atteinte. Néanmoins les techniques d'imagerie classiques ne permettent pas d'analyser finement cette réorganisation et d'en appréhender son rôle potentiel dans la pathologie.

Le but de ce projet est de caractériser le remodelage structural des fibres nerveuses dans l'articulation arthritique par la technique d'imagerie par feuillet de lumière qui permet de visualiser un organe entier en 3D. Cette étude permettra de mieux caractériser les interactions des fibres nerveuses avec les vaisseaux sanguins et les cellules du système immunitaire (macrophages). Elle permettra aussi de définir le rôle de canaux ioniques dans ce remodelage. Cette étude apportera des informations clés pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour réaliser ce projet, 250 souris seront utilisées afin de réaliser un ensemble de marquages immunofluorescents des fibres nerveuses, des vaisseaux sanguins et des cellules immunitaires, à 2 stades clés de la pathologie. La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée. Réduction du nombre d'animaux : les pattes controlatérales serviront de contrôle aux pattes enflammées et des doubles ou triples marquages seront réalisés simultanément quand cela est possible pour limiter le nombre d'animaux utilisés. Raffinement : le nombre de souris par cage respectera les directives européennes du 1er février 2013, sachant que le projet utilise de jeunes adultes entre 20 et 25g, nécessitant 70 cm² par individus dans les cages, soit 5 animaux par cage de 374 cm². L'environnement des animaux sera enrichi avec des dômes en carton. Une surveillance accrue des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux. Les animaux recevront de fortes doses d'analgésiques et d'anesthésiques pour réduire toute douleur au moment de la perfusion. Une surveillance accrue des

animaux sera réalisée pendant le développement de la pathologie et des points limites sont définis. Remplacement : le remodelage des fibres nerveuses ne peut s'évaluer in fine que sur des animaux vivants, aucun modèle cellulaire n'est disponible à ce jour.

16841 Les cancers de la tête et du cou (H&N) sont les sixièmes cancers les plus fréquents avec plus de 500 000 cas d'incidents signalés chaque année dans le monde. Deux essais randomisés importants ont montré que chez les patients atteints d'un cancer de H&N à haut risque, l'utilisation simultanée de la radiothérapie et de la chimiothérapie était supérieure à la radiothérapie seule en ce qui concerne la survie sans maladie et/ou la survie globale. Depuis quelques années, les traitements en oncologie ont évolué vers une approche de nanomédecine aux côtés de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie. L'incidence des cancers de H&N liés au papillomavirus humain (HPV) augmente rapidement dans le monde entier. Les patients atteints d'un cancer H&N lié au HPV sont généralement plus jeunes, en bonne santé et ne présentent pas forcément des antécédents classiques de tabagisme et/ou d'alcoolisme. Les études ont montré les patients diagnostiqués avec un cancer H&N avaient tendance à mieux répondre à certains traitements que ceux non infectés par le HPV. Des essais sont actuellement en cours pour déterminer si les patients atteints d'un cancer H&N infectés par le HPV peuvent recevoir un traitement moins intensif, tout aussi efficace, mais avec moins d'effets secondaires. La norme de soins pour le sarcome des tissus mous (STS) comprend la radiothérapie externe en combinaison avec la chirurgie. La définition optimale du volume cible est essentielle pour assurer le contrôle maximal des maladies locales et éviter l'irradiation inutile des tissus sains au tour. L'impact des nouvelles techniques de radiothérapie et le moment de la radiothérapie, plus particulièrement si elle doit être administrée avant ou après la résection chirurgicale.

Dans ce projet, les nanoparticules (NPs) d'oxyde d'Hafnium testées (NBTXR3) sont inertes et conçues pour augmenter la dose de radiothérapie à l'intérieur de la tumeur, sans augmenter les dommages aux tissus sains. Ces nanoparticules génèrent des quantités très importantes d'électrons lors de leur exposition aux radiations ionisantes, amplifiant ainsi la dose d'énergie létale dans la tumeur. L'efficacité de la radiothérapie est ainsi démultipliée sans changer la dose de rayons X.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet antitumoral de nanoparticules administrées par injection intratumorale (IT) unique et activées par les rayonnements ionisants, par comparaison avec la radiothérapie seule, en termes de retard de croissance tumorale et de survie, associés à une très bonne tolérance chez les animaux.

Pour ce sujet, 3 lignées cellulaires humaines de cancer H&N (2 HPV négatif et 1 HPV positive) et 1 lignée de sarcome des tissus mous (STS) seront xenogreffées à des souris nude par voie sous-cutanée. Le choix de ces modèles s'est effectué selon des recherches bibliographiques rigoureuses, les lignées choisies étant considérées comme des modèles de référence en radiothérapie et basées sur l'avancement des essais cliniques.

Pour évaluer l'efficacité des nanoparticules activées par des rayonnements ionisants, plusieurs doses seront testées en fonction de la radiorésistance ou radiosensibilité de la lignée cellulaire, préalablement estimée *in vitro* ou selon des données de la littérature. Ces doses de rayonnements ionisants devront mettre en évidence un bénéfice du traitement par les nanoparticules, en termes de régression tumorale et/ou de survie par rapport à la radiothérapie seule. Après injection IT unique des nanoparticules, la dose de rayonnements ionisants sera délivrée localement en fraction sur la tumeur afin de se mettre dans les conditions utilisées en clinique chez les patients humains.

L'effet antitumoral des nanoparticules avec différents lots de NBTXR3 sera déterminé par mesure du retard de croissance tumorale, la détermination de l'efficacité antitumorale, et l'évaluation de l'évolution de la maladie au cours du temps.

Certaines souris porteuses d'une tumeur seront utilisées pour évaluer la dispersion des NPs dans la tumeur après injection intra tumorale par CT scan ou prélèvement de tumeur à la fin de l'étude pour les analyses en microscopie électronique ou immunomarquage.

Remplacement: L'efficacité des nanoparticules NBTXR3 activées par la radiothérapie pour les cancers de la tête et du cou reste inconnue. Nous sommes actuellement sans données cliniques ou précliniques sur ces nanoparticules pour ce type de pathologie cancéreuse. Les études prévues évalueront le retard

de croissance tumorale, et la tolérance au traitement par les animaux, dans le contexte d'un système immunitaire complet. En effet, les interactions avec un système immunitaire complet sont indispensables pour étudier les effets des nanoparticules NBTXR3 dans le cancer de la tête et du cou. Ainsi, le recours à l'animal est incontournable. Les résultats permettront d'avancer éventuellement vers un développement en thérapeutique humaine.

Réduction: Le calcul du nombre d'animaux nécessaire (au maximum 1000 souris) a été réalisé à l'issue d'une étude statistique poussée permettant de limiter au strict minimum la quantité d'animaux utilisés tout en garantissant la robustesse des études. En cas de résultat non conforme aux hypothèses, l'étude sera arrêtée immédiatement.

Raffinement: L'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les animaux, seront pris en compte afin de les réduire ou de les supprimer par des analgésiques. Une anesthésie locale à la lidocaïne sera pratiquée systématiquement avant un geste pouvant occasionner une angoisse ou de la douleur à savoir l'injection des cellules tumorales en sous cutané. Une anesthésie gazeuse à l'isoflurane sera mise en place pour l'injection des nanoparticules par voie intra tumorale afin d'éviter une douleur liée à la pression intratumorale.

La surveillance clinique quotidienne (examen de santé) permettra de détecter précocément tout signe clinique et de le traiter. Les points limite seront strictement appliqués.

16842 Les camélidés (chameaux, dromadaires, lamas, alpacas, vigognes) possèdent dans le sang 2 types d'anticorps : des anticorps conventionnels constitués par un hétérotétramère de chaînes lourdes et légères et des anticorps simple chaîne constitués par un homodimère de chaînes lourdes sans chaînes légères. Le site de reconnaissance de l'antigène des anticorps simple chaîne est constitué d'un seul domaine variable appelé VHH ou nanobodies. Ces anticorps simple chaîne sont parfaitement fonctionnels et ils reconnaissent un antigène avec une affinité équivalente à celle d'un anticorps conventionnel.

A l'heure actuelle les VHHs ou nanobodies sont une alternative aux anticorps conventionnels car ce sont des molécules de petite taille (10 fois plus petite qu'un anticorps conventionnel), très stable, qui se produisent très bien et qui sont facilement ingénierables pour leur coupler par exemple des fluorophores ou des agents de contraste. De plus, ces VHHs sont maintenant utilisés en immunothérapie.

Pour obtenir ces anticorps, des alpagas sont d'abord immunisés. Une fois immunisés, les cellules productrices de ces anticorps sont isolées à partir du sang de ces animaux. Les VHHs sont ensuite sélectionnés par « phage display » puis produits dans des bactéries. Une quinzaine de projets par an est réalisé pour isoler des VHHs reconnaissant des protéines de virus, bactéries ou parasites, des protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer ou des récepteurs membranaires.

Une seule procédure de sévérité légère est réalisée dans ce projet en utilisant 10 alpagas sur 5ans.

Les animaux sont hébergés dans une ferme et disposent d'un grand enclos (> 1 ha). Ce sont des herbivores mais l'exploitant agricole leur fournit de la paille en hiver pour pallier au manque d'herbe. Les animaux sont tondus environ tous les 2 ans. Le vétérinaire vérifie l'état sanitaire des animaux lors de ses visites (4-5 / an). Ceux-ci sont vermifugés une fois par an par le vétérinaire. Si leur état sanitaire le nécessite, celui-ci vient sur place pour les soigner. Une armoire à pharmacie contenant les médicaments pour les premiers soins est disponible sur place.

Le recours à un processus d'immunisation d'alpagas est obligatoire car nous n'avons pas encore réussi à trouver de techniques alternatives performantes pour nous en dispenser. L'émergence de règles éthiques visant à préserver autant que possible le bien-être des animaux nous amène à adapter nos procédures pour les prendre en compte : Un seul animal est utilisé par campagne d'immunisation et il est immunisé avec plusieurs antigènes, surveillance renforcée des animaux avec un suivi quotidien, respect des procédures d'intervention technique recommandées par les autorités.

16843 Ce projet s'inscrit dans le développement d'un vaccin destiné à protéger contre une maladie mortelle chez une espèce de carnivore domestique. Le but est d'évaluer, après inoculation à cette espèce,

l'atténuation de la virulence du virus reproduit en laboratoire et modifié par différents procédés dans le but d'en faire un candidat vaccinal.

La réalisation de ce projet comprend une procédure expérimentale.

Ce projet requiert au maximum l'utilisation de 96 carnivores domestiques.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes expérimentales alternatives,
- un nombre d'animaux envisagé par groupe déterminé dans le but d'obtenir des données valides,
- un hébergement des animaux en groupe de manière à ne pas induire un stress d'isolement,
- un recours à l'anesthésie générale lors de certaines phases, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal,
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long de la procédure,
- des points limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux.

16844 Le cortex cérébral est un tissu dont la surface est extrêmement plissée, formant des circonvolutions appelées parfois 'sillons' dont la forme et les motifs sont une signature unique de l'individu, au même titre que les empreintes digitales. Par ailleurs il a aussi été montré que ces plis et leurs motifs peuvent être perturbés par la maladie et donc peuvent en être des marqueurs. Cependant, la très grande variabilité de motifs entre les individus rend la tâche difficile par exemple pour distinguer un motif 'sain' d'un motif pathologique. Le mécanisme de formation de ces plis lors du développement doit donc être étudié pour comprendre cette variabilité apparente. Chez les primates dont le cortex est plissé (singes de l'ancien monde, grands singes, humains), le plissement du cortex se fait entre la moitié et la fin de la gestation, avec des changements importants d'une semaine à l'autre. A la naissance, la presque totalité des motifs de plissement observables à l'âge adulte le sont déjà. Il est donc impératif, afin de le comprendre, d'observer et de quantifier l'évolution du plissement cortical pendant la deuxième moitié de la gestation, à un rythme d'au moins une fois par semaine. L'outil privilégié pour une telle observation est l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Il n'est pas possible pour des raisons légales d'effectuer une telle étude sur des femmes enceintes sans pathologie. Cependant, grâce à leur proximité phylogénétique avec les humains, les primates non-humains (PNH) peuvent nous permettre de comprendre ce mécanisme commun de plissement cortical pré-natal. L'objectif de ce projet est donc d'effectuer une étude sur 10 femelles babouin (*Papio Anubis*) gestantes et par conséquent sur leur fœtus, afin d'observer longitudinalement par IRM le développement cérébral à la fréquence d'une acquisition par semaine, ce qui constituera une observation unique à ce jour. Pour ce projet 20 femelles gestantes seront échographiées afin d'en sélectionner 10 qui seront au bon stade de gestation au moment des acquisitions. Le projet inclut donc N=30 animaux (20 femelles et 10 fœtus).

La règle des 3R est respectée. Remplacement: pour les raisons explicitées ci dessus, le seul modèle possible est le primate non-humain avec un cortex plissé. Réduction: chacune des 10 femelles aura 10 images ce qui nous permettra de constituer une base de données de 100 images. La variabilité inter-sujets chez l'humain est telle qu'on estime qu'il faille au moins 50 sujets pour obtenir des statistiques robustes. Cette variabilité est inférieure chez le babouin, nous avons réduit le nombre de sujets à 10, ce qui est cependant un minimum pour observer des motifs de plissement variables. Raffinement: le stress induit pour les femelles gestantes sera réduit autant que possible (capture sans contention, transport dans le noir), l'anesthésie est optimisée pour supprimer toute neurotoxicité, et des tests comportementaux seront effectués 6 mois après la naissance pour valider l'absence d'effet indésirables sur le fœtus en développement. Ce raffinement a été mis au point lors d'une étude préliminaire déjà effectuée sur une femelle et son fœtus, ce qui a permis de vérifier la viabilité de l'expérience et l'absence d'effet délétère sur le fœtus.

16845 Les personnes âgées ou dites vulnérables (comorbidité) sont particulièrement sensibles au Covid-19 (Coronavirus disease 2019), une maladie provoquée par le virus SARS-CoV-2. Le vieillissement s'accompagne d'un phénomène d'immunosénescence qui favorise la susceptibilité aux infections. La sénescence cellulaire est un phénomène naturel lié au stress (oxydatif, métabolique) qui s'amplifie avec l'âge et dont l'impact sur les réponses immunes, notamment anti-infectieuses, et sur le contrôle des réponses inflammatoires est encore mal compris.

Notre objectif est triple. Nous souhaitons mieux cerner l'impact de l'infection par le SARS-CoV-2 sur le processus de sénescence cellulaire. Nous souhaitons également déterminer l'influence d'une sénescence préexistence (liée à l'âge ou à un facteur de comorbidité) sur la réplication virale et la pathogenèse associée à l'infection par le SARS-CoV-2. Enfin, nous souhaitons étudier les conséquences de la déplétion des cellules sénescents sur la réplication virale et la physiopathologie. Ce programme pourrait conduire au développement de nouvelles méthodes permettant de contrôler le COVID-19.

A ce jour, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire les interactions hôte-virus aboutissant au COVID-19. L'évaluation de la pathogénicité du SARS-CoV-2 pourra aider à développer de nouvelles stratégies de lutte qui nécessitent des modèles *in vivo* pertinents qu'il n'est pas possible à ce jour de remplacer par des tests *in vitro* ou *in silico*. Il est admis que le modèle de la souris exprimant le récepteur ACE2 humain (le récepteur du virus) est pertinent pour le suivi de la réplication du virus et pour décrire la physiopathologie associée à l'infection par le SARS-CoV-2. L'évaluation de l'efficacité des composés antiviraux contre SARS-CoV-2 peut être évaluée dans ce modèle. Les études *in vivo* sont requises avant tout passage à l'homme.

Deux procédures expérimentales sont décrites : Impact de l'infection sur la sénescence cellulaire (procédure 1) et rôle des cellules sénescents sur la réplication virale et la physiopathologie liée à l'infection (procédure 2). Des souris transgéniques exprimant le récepteur ACE2 humain seront utilisées. Nous proposons des traitements avec des composés pharmacologiques dont certains sont déjà utilisés chez l'homme.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R.

Remplacement : il n'existe pas de méthode de substitution pour étudier les effets physiopathologiques de l'infection par SARS-CoV-2 et pour évaluer l'efficacité de médicaments. Le modèle souris est pertinent pour ce type d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe sera utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Les expériences seront répétées 2 fois avec un nombre de 6 animaux par groupe expérimental. Au total, 900 souris seront nécessaires. 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. Raffinement : Le raffinement est obtenu par (i) la mise au point de procédures rigoureuses, (ii) la formation du personnel, (iii) un suivi quotidien de l'état de santé des animaux (iv) le recours à des procédures non invasives et non douloureuses.

16846 Toute leur vie, les individus doivent prendre des décisions en choisissant la meilleure option parmi une multitude d'autres, qui leur permettront ensuite d'orienter le meilleur comportement pour leur survie. Afin d'augmenter leur chance de faire le meilleur choix, les animaux utilisent des informations de leur environnement, mais aussi de leur état interne (par exemple, la faim ou la soif). Or, les mécanismes biologiques de décision basée sur la valeur des options auxquelles nous faisons face ne sont pas connus. Pour étudier ces mécanismes, nous utiliserons différents modèles de souris génétiquement modifiées nous permettant de manipuler et enregistrer l'activité de cellules nerveuses restreintes dans ces différentes régions cérébrales d'intérêt, et ce sur le même animal pendant plusieurs stades du comportement (apprentissage et mémoire). Les données seront obtenues chez des souris sujettes, ou non, à un régime riche en calories.

Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 1890 souris adultes (mâles et femelles), car ce projet sera réalisé sur 5 ans. Nous avons optimisé les protocoles afin de réduire au maximum le nombre de souris

utilisées 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: 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. 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 ou encore le stockage de graisse. Ainsi, il est absolument nécessaire d'étudier un organisme entier et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut le remplacer. Enfin, 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. Pour minimiser le stress les animaux, les cages seront isolées de tout bruit extérieur et suivront un cycle naturel de jour/nuit. La nourriture et l'eau seront disponibles à tout moment de la journée. 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 chaque procédure expérimentale, les animaux sont manipulés fréquemment afin de les habituer aux expérimentateurs et réduire ainsi leur stress. Enfin, pour les procédures impliquant une neurochirurgie, un protocole d'anesthésie et d'analgésie péri-opératoire est en place afin de garantir la bonne prise en charge de nos animaux. La santé des animaux sera surveillée tout au long de l'expérience et évaluée grâce à une grille codifiant le niveau de bien être. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si un premier signe de souffrance est détecté. Les souris seront également suivies par du personnel formé et compétent pour leur bien-être durant toute la durée du projet.

16847 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neurologique chronique qui affecte plus de 2,3 millions de personnes dans le monde. Le système endocannabinoïde (SEC) - principalement formé par les récepteurs aux cannabinoïdes de type 1 (CB1) et leurs ligands endogènes - protège physiologiquement contre les dommages neuronaux et l'inflammation dans la SEP. En effet, les médicaments à base de cannabis présentent une utilité clinique dans la SEP. Néanmoins, un inconvénient majeur de ces médicaments dans la thérapie humaine est la probabilité d'effets secondaires liée à la dose. L'hypothèse actuelle suggère que les médicaments modulant les endocannabinoïdes, pour agir sur la SEP, dépendent de l'activation relative des populations du récepteur CB1 dans différents emplacements cellulaires. À cet égard, les récepteurs CB1 présentent un modèle d'expression hétérogène dans le tissu nerveux ; étant présents dans la membrane plasmique des neurones et des astrocytes. Dans ce contexte, étudier la spécificité cellulaire et subcellulaire des effets dépendants des récepteurs CB1 dans la SEP a le potentiel de contribuer au développement de nouvelles stratégies de traitement plus efficaces.

Nous voulons maintenant étudier ce système dans la SEP à l'aide d'une nouvelle technique, la photométrie par fibre optique. Cette technique, essentielle pour poursuivre nos études, permet d'enregistrer l'activité et le métabolisme cellulaires dans le cerveau de souris éveillées et libres de se mouvoir. Le projet a pour finalité une meilleure compréhension du système endocannabinoïde et de son rôle dans la SEP qui pourrait permettre la mise en place de nouvelles et meilleures cibles thérapeutiques. 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. Notre projet inclura 720 souris chez lesquelles la photométrie par fibre optique sera couplée à différents paramètres métaboliques.

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*...)

Réduction : les animaux utilisés dans chacun des groupes expérimentaux n'excéderont pas 10 animaux c'est-à-dire le nombre minimal d'échantillons permettant l'application de tests statistiques classiques dans le domaine. Ce nombre permet de garantir une bonne interprétation des résultats. Néanmoins, si l'expérience nous montre que les échantillons peuvent être réduits, ce nombre sera réduit en conséquence.

Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement par un personnel qualifié et le milieu d'élevage des souris est enrichi (matériel de nidification), dans des conditions optimales de température, d'humidité et de lumière pour les souris. De plus, pour chaque procédure expérimentale, des méthodes additionnelles et spécifiques seront appliquées comme : le placement de l'animal dans sa cage sous une source de chaleur avec de la nourriture à proximité suite à la chirurgie.

16848 Ce projet a pour objectif de développer des solutions pour favoriser l'adaptation des porcs en systèmes plein air et / ou biologique. En particulier, il s'agit d'améliorer la santé et la robustesse des porcelets et surtout de diminuer leur mortalité néonatale. En effet, la mortalité néonatale, déjà élevée en élevage conventionnel porcin, est usuellement encore plus importante en élevage biologique. Pour développer des solutions pour favoriser l'adaptation des porcs en systèmes biologiques, un dispositif d'amélioration génétique de la survie des porcelets, de leur santé et de leur robustesse, a été proposé. Une lignée de truies sélectionnées génétiquement pour un meilleur taux de survie néonatale dans les conditions de l'élevage biologique est en cours de développement. L'amélioration des mères sur la survie de leur progéniture sera obtenue par l'utilisation de verrats améliorateurs sur la survie et le choix comme futures reproductrices des filles issues des truies les plus performantes à chaque génération. Un progrès génétique est attendu au fil des générations. Les truies (48 par génération de sélection) et leurs portées seront élevées selon les pratiques usuelles de l'unité expérimentale dans laquelle sera réalisée l'étude, et qui est soumise au cahier des charges de l'Agriculture Biologique.

Le présent protocole s'intéresse aux porcelets, et a pour objectif de déterminer si la sélection génétique a eu un impact sur des caractéristiques physiologiques des porcelets importants pour leur survie néonatale, telles que leur aptitude à résister au risque infectieux, ou à maintenir une balance énergétique satisfaisante. L'étude impliquera un total de 432 porcelets produits au cours des 3 générations successives, qui sont élaborées chacune avec un troupeau de 48 truies (donc 144 truies sont impliquées au total). Seuls des porcelets issus de la seconde gestation des truies seront étudiés, pour déterminer certaines de leurs caractéristiques physiologiques, potentiellement associées à la survie néonatale.

Trois porcelets de poids moyen seront choisis par portée à 24-72h de vie et un prélèvement sanguin leur sera réalisé.

Nous mesurerons dans le sang les concentrations d'indicateurs du transfert de l'immunité de la mère au jeune, d'inflammation, du stress oxydant, du métabolisme énergétique et de la maturité des nouveau-nés. Les événements de santé relatifs aux porcelets seront de plus enregistrés pendant les 72 premières heures de vie, et les animaux seront pesés à la naissance.

La règle des 3R a été prise en compte :

-remplacer : le projet concernant spécifiquement le porcelet en lactation, son utilisation ne peut être remplacée.

-réduire : il est nécessaire pour évaluer le progrès génétique au fil des générations de sélection, de décrire les caractéristiques des nouveau-nés de chacune des truies impliquée dans le programme de sélection à chaque génération (soit 144 truies). Néanmoins, nous appliquerons le principe de réduction en n'étudiant qu'une seule portée par truie et en ne prélevant que trois porcelets dans cette portée, alors que les portées contiennent environ 15 porcelets chacune.

-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 porcelets et leurs mères bénéficieront ainsi d'un milieu de vie enrichi par rapport à une animalerie porcine conventionnelle. Par ailleurs, le nombre de prises de sang par individu a été réduit à une seule,

ce qui limite le nombre d'interventions humaines stressantes sur les animaux pendant la période de lactation.

16849 La formation des étudiants de pharmacie requiert qu'ils soient capables de faire la caractérisation pharmacologique de médicaments potentiels sur des modèles animaux simples, qu'ils sont susceptibles de manipuler dans leur future vie professionnelle. En effet, les tests animaux constituent une étape obligatoire dans le circuit de développement du médicament à laquelle il est indispensable que les étudiants soient initiés, et qui ne peut être remplacée par des modèles cellulaires ou des logiciels de simulation.

A cette fin, nous organisons plusieurs séances de Travaux pratiques (TP) leur permettant de se familiariser avec l'expérimentation animale *in vivo*. Lors de ces TP, les étudiants étudient les effets comportementaux (tests d'Irwin, test de la plaque chauffante) ou physiologiques (inflammation, glycémie...) de l'administration de différentes substances à des souris. Cela représente au maximum, pour l'ensemble des TP de pharmacie, 90 souris par an soit un total de 450 souris sur 5 ans. Ce chiffre a été réduit autant que possible, notamment en permettant la réutilisation des souris d'une séance à l'autre à condition qu'elles aient eu un laps de temps suffisant pour que cela ne génère aucune souffrance et que les procédures n'interfèrent pas entre elles.

Ces TP permettent également de former les étudiants aux règles d'éthique en expérimentation animale. Nous les sensibilisons au bien-être animal et aux conditions d'hébergement et de manipulation des animaux, nous leur expliquons le contexte réglementaire strict d'utilisation de ces animaux. Il s'agit d'une occasion de discuter avec les étudiants des intérêts scientifiques de l'expérimentation animale, tout en mettant en balance le contexte réglementaire et la nécessaire prise en compte du bien-être animal.

Enfin, compte tenu du grand nombre de manipulateurs, les souris sont suivies avec un soin tout particulier et les points limite sont clairement définis afin de détecter et prendre en charge précocement tout signe de souffrance. Ainsi, nous utilisons des souris femelles, bien que les variations hormonales puissent potentiellement légèrement biaiser nos résultats, afin de limiter les risques d'agressivité et de blessure des animaux dans leurs cages. Nous veillons après chaque TP à reconstituer les groupes de souris initiaux dans les cages, afin de les perturber le moins possible. Enfin, nous avons bénéficié d'une dérogation de l'UFR pour que le taux d'encadrement de ce TP soit augmenté (2 enseignants pour un groupe de 15 étudiants), afin de pouvoir mieux former les étudiants et surveiller la façon dont ils manipulent les animaux lors de ce TP particulièrement sensible.

16850 Les Microvésicules (MV) constituent une population hétérogène de petites vésicules extracellulaires résultant du bourgeonnement de la membrane plasmique des cellules de l'organisme. Longtemps considérées comme de simples débris cellulaires dépourvues de fonction, elles sont désormais reconnues comme de véritables entités dotées d'activités biologiques, grâce à l'expression de protéines issues de la cellule parentale mais également d'acide nucléique. Elles sont retrouvées dans les fluides biologiques tels que le sang et peuvent participer à des processus biologiques. Concernant la formation d'un caillot sanguin, les MV ont d'abord été décrites comme des entités procoagulantes, favorisant la formation d'un caillot. Cependant, des activités opposées, entraînant la dissolution d'un caillot, ont également été décrites sur certaines sous-populations de MV. La résultante de ces effets opposés sur la formation et dégradation d'un caillot sanguin semble dépendre d'une balance entre leurs activités procoagulantes (formation) et fibrinolytiques (dégradation) que nous appelons "balance coagulolytique des MV". Grâce aux différentes expérimentations *in vitro*, réalisées dans le but d'étudier la balance coagulolytique des différentes sous-populations de MV circulantes, nous savons maintenant qu'il faut considérer chaque sous-population de façon indépendante. Mais, à ce jour, ces différents potentiels procoagulants et profibrinolytiques des MV *in vitro* n'ont pas été explorés *in vivo*. En effet, la formation d'un caillot *in vivo* est un processus complexe mettant en jeu de nombreuses entités cellulaires, subcellulaires et protéiques. Il est donc essentiel pour étudier l'impact des différentes sous-populations microvésiculaires dans ce processus de réaliser les manipulations dans un modèle animal intégrant l'environnement complexe de formation et de dégradation d'un caillot.

Ainsi le projet consistera à évaluer le rôle de MV d'origine cellulaire différente, sur la formation et la dégradation d'un caillot, dans un modèle murin de thrombose. Dans ce but, nous allons dans un premier temps injecter chez des souris saines des MV d'origine exogène (humaine) ayant des balances coagulolytiques connues et différentes. Dans un deuxième temps, dans le but d'étudier l'effet de sous-populations de MV endogènes, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées pour des gènes impliqués dans les mécanismes de vésiculation (ABC-A1 et TMEM16F) et le système Cre/Lox pour cibler les différentes origines cellulaires des MV. Dans les deux cas, l'effet d'une sous-population de MV sera évalué grâce à un modèle maîtrisé et validé de suivi d'un caillot sanguin par microscopie intravitale. L'utilisation de ce modèle permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés, car plusieurs caillots peuvent être formés chez une même souris.

L'ensemble des procédures envisagées nécessitera au maximum 742 souris sur 5 ans. Au cours de chaque procédure nous utiliserons le nombre d'animaux, strictement suffisant et nécessaire pour mener à bien cette étude en respectant la règle des 3R : réduire, raffiner et remplacer. L'angoisse des animaux sera dépistée et évitée. Les animaux seront hébergés en groupe (5 individus par cages) dans des conditions d'accès à l'eau et l'alimentation et leur milieu sera enrichi (sous la forme de carré de coton pour fabriquer leur nid) afin de limiter le stress.

L'objectif de ce travail est de renforcer l'utilisation des MV comme biomarqueur en pathologie humaine en montrant qu'elles sont non seulement le reflet d'une situation pathologique, mais également qu'elles participent activement à l'hémostase physiologique et pathologique.

16851 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 s'avèrent être complémentaires, en mettant en œuvre des itérations entre la simulation informatique et les résultats expérimentaux, afin d'affiner la compréhension du système à chaque étape. Dans un premier projet, nous avons utilisé le modèle animal Souris afin de générer des échantillons de tumeurs pulmonaires portant des mutations à caractère oncogène, c'est à dire susceptibles d'entraîner l'apparition de cancers.

Ces échantillons ont été analysés histologiquement, mais aussi au niveau des gènes et des protéines exprimés dans ces tissus et impliqués potentiellement dans la croissance tumorale.

L'ensemble des données générées ont été utilisées pour mettre en place une vaste modélisation *in silico* dont le but est d'aider à la prédiction ou la validation de nouvelles cibles potentielles pour le développement de médicaments et le traitement des cancers.

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 d'efficacité des traitements *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 2 lignées pertinentes et souhaitons traiter celles-ci avec 2 molécules différentes, et ce à deux stades différents (précoce et 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 statistique nécessaire et les impératifs de réduction que nous endossons dans notre étude.

Par ailleurs, la modélisation *in silico*, puis la validation des hypothèses *in vitro*, permet de se focaliser sur uniquement les modèles animaux et les molécules thérapeutiques d'intérêt pour une validation finale *in vivo*, dans un organisme entier. Les modèles et molécules n'ayant pas passé avec succès les

étapes *in vitro* ne seront pas évaluées *in vivo*, d'où une réduction globale du nombre d'animaux utilisés dans ce projet, grâce à cette stratégie.

Au total, dans ce projet, nous prévoyons d'analyser 120 animaux (2 groupes traités + 1 groupe contrôle non traité, comprenant chacun 10 animaux, à deux temps expérimentaux, pour 2 lignées différentes).

RAFFINEMENT : les deux modèles de Souris 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 d'une gêne respiratoire, d'une perte de poids ou d'une prostration. 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 une pesée hebdomadaire.

REPLACEMENT : 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*.

16852 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. Une fois les tumeurs suffisamment développées deux stratégies thérapeutiques seront évaluées. 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 50 souris pour l'évaluation de l'effet "radioenhancer" des nanoparticules d'or ciblant les tumeurs et 76 souris pour l'évaluation de l'effet "radioenhancer" des nanoparticules d'or ciblant le stroma tumoral associées à la chimiothérapie (soit 126 souris maximum au total). La prolifération tumorale sera évaluée par la mesure des tumeurs au pieds à coulisse.

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. Le taux de prise de greffe étant de 80%, nous calculerons donc le nombre correct d'animaux porteurs de tumeurs.

L'étude sera répétée si les résultats obtenus sont positifs ainsi l'efficacité du traitement sera démontrée par deux études indépendantes. Si au contraire les résultats étaient négatifs cela aura permis de réduire le nombre d'animaux sacrifiés.

Raffinement : L'injection des cellules se fera sous anesthésie. La dose de chimiothérapie injectée sera déterminée sur la base d'une étude préliminaire ainsi on sera sûre de ne pas utiliser une dose toxique. 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.

Domages/Avantages : Cette étude permettra de démontrer l'efficacité des nanoparticules dans le traitement des PDAC. Le fait de répéter l'étude plutôt que de la réaliser en une seule fois sur un nombre plus grand d'animaux permettra de limiter le nombre d'animaux sacrifiées en cas de résultats négatifs. Le passage par le modèle *in vivo* est pour l'instant inévitable pour tester de nouvelles thérapies.

16853 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), appelée aussi Maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative touchant spécifiquement des neurones, appelés motoneurones, qui innervent les muscles. La maladie se déclare à l'âge adulte, elle provoque la paralysie du patient et son issue est fatale. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif. La découverte d'un lien génétique chez certains patients a permis de développer plusieurs modèles murins de la SLA. Des découvertes récentes indiquent que les motoneurones présentent des changements de leurs propriétés électriques avant le début de la dégénérescence.

Le but de ce projet est de déterminer si ces altérations sont dues à une hyper-réactivité des motoneurones qui se mettraient à répondre à des perturbations de leur environnement de façon exacerbée par rapport à la réaction qui serait produite par la même perturbation dans une souris saine.

Pour tester cette hypothèse, une perturbation artificielle, sous la forme d'un traitement pharmacologique chronique, est introduite et la réponse des motoneurones de souris mutantes est comparée à celle des motoneurones de souris saines. Au total, nous testerons 6 agents pharmacologiques différents et le nombre de souris utilisées sera de 1200 sur une durée de 5 ans.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : Aucune simulation numérique sur ordinateur ni système *in vitro* n'est capable à ce jour de capturer l'extrême complexité des réseaux neuronaux impliqués dans ce projet, le recours à l'animal est donc indispensable.

Réduire : Les tests statistiques prévus et le schéma expérimental ont été choisis pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés en permettant d'obtenir le plus d'informations possibles sur chaque animal.

Raffiner : Afin d'abolir la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, le traitement chronique sera réalisé à l'aide d'une pompe osmotique pour éviter les injections répétées, et l'étude des propriétés électriques des motoneurones se feront sous anesthésie générale. Les animaux sont surveillés régulièrement et 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 physiopathologiques qui aboutissent à la dégénérescence des motoneurones dans le SLA. Ils pourraient déboucher sur une solution thérapeutique innovante pour augmenter de façon significative la survie et la qualité de vie des patients atteints de SLA.

16854 Les malformations vasculaires congénitales sont en grande partie liées à des mutations génétiques non héritées des parents (les parents ne sont pas porteurs de la mutation) qui apparaissent pour une raison inexpliquée au cours du développement embryonnaire. On dit de ces mutations qu'elles sont en mosaïque. Il existe différents types de mutations qui s'accompagnent de présentations cliniques variées.

Certaines de ces mutations, comme celles activant l'expression de la protéine PIKC3A, conduisent à des malformations vasculaires lorsqu'elles apparaissent au cours du développement. Elles sont aussi

présentes dans certains types de cancer, ce qui a permis d'utiliser des médicaments validés dans les traitements anti-cancéreux pour traiter ces maladies génétiques. La protéine KRAS présente un nouvel exemple d'une protéine mutée dans des cancers et chez des patients présentant des anomalies vasculaires, et offre, de façon analogue, la possibilité de traiter ces patients avec des drogues anti-cancéreuses validées en clinique. Pour cela, nous voulons créer de nouveaux modèles pré-cliniques chez la souris, afin d'évaluer l'impact de ces mutations KRAS dans différents types de cellules de l'organisme (vasculaires, artérielles, endothéliales). Nous explorerons la physiopathologie des malformations liées à cette mutation et nous testerons l'efficacité d'inhibiteurs spécifique de cette voie de signalisation cellulaire pour bloquer l'activité excessive de ce gène malade.

Le projet durera 5 ans. Tout au long de l'expérimentation, nous appliquerons la règle des "3R" :

1- Utilisation d'un nombre minimal d'animaux pour avoir la puissance statistique (n= 600 souris);

2-Le remplacement dès que possible les expériences animales par des expériences *in vitro*;

3-Enfin, nous éviterons toute souffrance inutile des animaux en les surveillant régulièrement. Le traitement est donné sous forme d'injection intrapéritonéale quotidienne qui sera effectuée par un technicien expérimenté. Le volume des injections sera réduit au minimum possible. Par ailleurs, des points-limites précis ont été établis (poids, comportement, aspect du poil, fréquence respiratoire), entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Nous espérons ainsi identifier de nouveaux traitements médicamenteux qui pourraient améliorer les conditions de vie des patients porteurs de ces mutations génétiques et pour lesquels aucun traitement satisfaisant n'existe.

16855 Ce projet décrit des travaux de recherche fondamentale qui visent à mieux comprendre certaines fonctions du cervelet. Le cervelet a longtemps été considéré comme une structure cérébrale essentiellement impliquée dans la coordination motrice, l'équilibre et le maintien de la posture. Cependant de nombreuses observations indiquent qu'il participe également à un grand nombre de fonctions non motrices, voire cognitives, telles que l'interprétation des informations sensorielles, l'orientation spatiale, la régulation des émotions ou la capacité de planification. Certains dysfonctionnements cérébelleux pourraient ainsi être impliqués dans certains troubles neurodéveloppementaux (autisme ou dyslexie) ou certaines maladies psychiatriques. Les fonctions non motrices du cervelet sont assurées par des connexions neuronales dites « ascendantes » reliant le cervelet à des structures du cerveau antérieur. Si l'existence de ces voies ascendantes est bien avéré, le détail de leur organisation est encore très mal connu. Cette organisation est potentiellement complexe : le cervelet est en effet subdivisé en un grand nombre de modules pouvant chacun communiquer avec un ensemble spécifique de structures du cerveau antérieur. Les expériences de ce projet ont pour objectif principal de cartographier en détail les connexions des modules cérébelleux avec différentes régions du cerveau antérieur chez le rongeur (rats et souris). Nous nous focaliserons en particulier sur trois voies spécifiques impliquées dans la discrimination tactile, l'orientation spatiale et les réactions de peur face à un danger.

Nous utiliserons le virus de la rage, qui est un outil de choix pour identifier des chaînes de connexions neuronales. En effet, depuis son site d'inoculation, ce se propage au sein des chaînes neuronales de manière exclusivement rétrograde, c'est à dire en sens inverse des influx nerveux, et transsynaptique, c'est à dire en « sautant » d'un neurone à l'autre au niveau de leurs connexions synaptiques. Ce processus est dépendant du temps, de sorte que plus le temps d'incubation du virus est long, plus il atteint des éléments de la chaîne neuronale distants du site d'injection. Ainsi en injectant une petite quantité de ce virus dans une structure cérébrale identifiée et en utilisant un temps d'incubation approprié (typiquement 1-3 jours), le virus se retrouvera dans les modules cérébelleux en amont de cette structure mais pas dans ceux projetant vers d'autres structures. Les injections seront réalisées par une approche chirurgicale sous anesthésie et analgésie sur des rats ou des souris. Les rats seront utilisés pour cibler des structures cérébrales de petite taille. Les souris seront préférées pour les injections dans des structures de plus grande taille, mais surtout pour cartographier des réseaux qui seront étudiés par ailleurs dans des recherches faisant appel aux approches génétiques (en particulier des lignées transgéniques). Rats et souris seront mis à mort sous analgésie et anesthésie profonde

pour réaliser des marquages immunohistochimiques permettant de révéler la distribution du virus. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode plus efficace que celle utilisant le virus de la rage pour révéler l'organisation de voies neuronales impliquant plusieurs connexions synaptiques successives.

En plus du virus de la rage, nous injecterons des traceurs neuroanatomiques conventionnels (comme la sous-unité beta de la toxine du choléra ou le jaune de diamidine) pour aider à identifier précisément le site d'injection et marquer le premier maillon des chaînes de neurones. Parmi ces substances, le virus de la rage est l'élément le plus à même de causer des complications pour le bien-être des animaux. Il s'agit en effet d'un virus répliquatif qui finit par entraîner des dysfonctionnements dans les neurones qu'il infecte. Cependant, aux temps d'incubation utilisés dans nos expériences

(~1-3 jours), aucun symptôme neurologique lié à l'infection rabique n'apparaît. Ainsi, la sévérité des procédures d'injection est classée modérée.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle dites « des 3 R » (remplacer, réduire et raffiner):

Remplacer. Les méthodes non invasives de cartographie des réseaux nerveux (par exemple l'imagerie par résonance magnétique) ne permettent pas de décrire les circuits neuronaux avec une résolution cellulaire suffisante pour les questions abordées dans ce projet. 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 n'infecte que les mammifères. Les rongeurs sont adaptés pour les objectifs de ce projet et sont en cohérence avec d'autres approches réalisées sur le même thème dans d'autres laboratoires.

Réduire. Nous estimons notre besoin maximal en animaux à 48 rats et 66 souris, soit un total de 114 animaux sur 5 ans. Le standard de publication pour ce type d'expérience requiert que chaque résultat soit reproduit chez au moins 2 animaux. Pour chacune des 16 situations expérimentales de ce projet, nous utiliserons le nombre minimal d'animaux pour atteindre ce standard. Mais du fait de la variabilité inhérente aux injections stéréotaxiques, nous estimons avoir besoin d'utiliser 6 à 8 animaux par situation expérimentale. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous réaliserons nos injections par petits groupes d'animaux espacés dans le temps pour d'une part mettre à profit l'expérience acquise progressivement et d'autre part s'assurer que des injections ne sont pas dupliquées inutilement.

Raffiner. Les prémédications, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires se feront selon des procédures validées par un vétérinaire. Les chirurgies seront réalisées par des personnels vaccinés, ayant suivi les formations réglementaires, ayant déjà pratiqué des injections stéréotaxiques dans les structures cibles et ayant les autorisations nécessaires pour travailler dans un laboratoire confiné de niveau 3 agréé pour l'utilisation du virus de la rage. 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 d'incubation relativement courte (1-3 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 les temps d'incubation utilisés dans ce projet sont trop courts pour l'apparition des symptômes de la rage.

16856 Les fistules digestives sont des pathologies digestives mutilantes définies par une communication anormale entre deux viscères (fistule interne) ou un viscère et la peau (fistule entéro-cutanée). Les principales causes de fistules digestives sont la maladie de Crohn (MC) et la chirurgie digestive (iatrogène). La prise en charge des fistules est complexe, associant un drainage et une cicatrisation dirigée. En cas d'échec, une nouvelle intervention chirurgicale peut être proposée, même si elle est le plus souvent mutilante et associée à un taux de mortalité élevée. Des premiers résultats ont montré l'intérêt des vésicules extra-cellulaires (VEs) dans la prise en charge mini-invasive et régénérative des fistules digestive. L'objectif de l'étude est de proposer un nouveau traitement innovant des fistules digestives en injectant directement à travers l'orifice externe des vésicules extra-cellulaires. Le modèle de rat vivant anesthésié est le modèle permettant la plus proche et simple des fistules digestives. Le modèle animal vivant ne peut être remplacé dans cet objectif par des modèles ex-vivo en raison de l'évolutivité du processus de formation des fistules (1 mois) et du temps nécessaire au processus de cicatrisation d'un mois pour évaluer l'impact du traitement. Ce projet est développé dans

le respect de la règle des 3 R: après des essais préalables sur simulateur, une première phase est prévue avec 40 rats pour évaluer cette technique. Au besoin et selon les résultats, un deuxième groupe de 40 rats est envisagé après modification de la technique. Le nombre total de rats nécessaires à la réalisation de ce projet est donc de 80 au maximum pour une durée de 4 ans. Pour éviter toute souffrance aux animaux, les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie pendant toute la durée de l'intervention. Une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée afin d'anticiper si nécessaire les douleurs. L'état de santé des rats sera suivi régulièrement. Dans le cas où le traitement serait à l'origine de douleurs visibles non soulagées par les antalgiques, de détresse ou de difficulté d'alimentation importante, le traitement sera interrompu et, si nécessaire, la mise à mort de l'animal sera anticipée. Il s'agit de la première étude qui évalue l'impact du traitement par VEs pour la cicatrisation des fistules gastro-cutanées. Cette étude animale justifiera l'application humaine ultérieure.

16857 La migraine est une pathologie qui a un fort impact sur la santé publique (12-15% de la population touchée). Les traitements pharmacologiques actuels montrent une efficacité limitée, tout particulièrement au stade chronique de la maladie (plus de 15 jours de migraine par mois). Le développement et l'évaluation des effets antalgiques de nouvelles molécules est donc indispensable pour l'amélioration des thérapeutiques. Nous proposons pour ce projet d'évaluer les effets d'un agoniste des récepteurs delta opioïdes (SNC80) dans un modèle de migraine par donneur de monoxyde d'azote (NO) chez le rat (mâle et femelle). L'étude et l'analyse de la douleur ne permet pas l'utilisation de méthodes alternatives à celle d'animaux vivants. En effet, la douleur est le résultat de mécanismes complexes intégrés au sein d'un système nerveux central. Chez le rat mâle et femelle, nous testerons la sensibilisation centrale développée à la suite d'injections intrapéritonéales (i.p) d'isosorbide dinitrate (ISDN, 10mg/kg), connu comme un donneur de monoxyde d'azote vasodilatateur et qui déclenche aussi chez l'homme des crises de migraines. Nous proposons donc utiliser la technique d'électrophysiologie (enregistrements extracellulaires de neurones centraux trigéminaux chez le rat anesthésié) pour mesurer les effets de l'administration de SNC80 sur les réponses de type A (non nociceptive) et de type C (nociceptive) aux stimulations mécaniques et électriques appliquées au niveau facial et méningé du rat, suite à 1 injection systémique (stade aigu) ou 5 injections répétées (stade chronique, 1 injection /jour / 5 jours) d'ISDN ou de sérum physiologique (témoins).

Pour ce projet et afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si distribution normale ou test non paramétrique dans le cas contraire). Le nombre de rats par groupe a été fixé à 10 en tenant en compte la complexité de ce type de manipulation et aussi du fait, qu'en moyenne et d'après les études précédentes, 20 % des rats ne sont pas répondeurs à l'ISDN (comme chez l'homme). 6 groupes de rats seront donc utilisés (G1: sérum physiologique+antagoniste; G2: SNC80 + Antagoniste; G3: sérum physiologique + ISDN1; G4: SNC80 + ISDN1; G5: sérum physiologique+ISDN5; G6: SNC80+ISDN5). Les données basales (avant injection) de chaque enregistrement électrophysiologie seront utilisées pour évaluer l'effet de la substance SNC80 (comparaison avant vs après). Les 2 sexes seront représentés ce qui portera le nombre de rats par groupe à n=20. Ainsi, 120 animaux seront utilisés dans ce projet. Lors des sessions d'injections répétées (5 jours), sachant que cette étude, du fait même de sa nature, ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergements sont optimisées (enrichissement social et environnement). De plus, toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie... mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection létale d'anesthésique. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de la procédure par injection létale d'anesthésique. Ce projet ne peut être réalisé via des méthodes alternatives ou substitutives (sans utilisation d'animaux vivants). En effet l'analyse de la douleur nécessite l'intégrité du système nerveux central même si nous pouvons, comme ici, employer une procédure sous anesthésie.

Par ce projet, nous entendons montrer et caractériser chez le rat l'effet antalgique du SNC80 dans la sensibilisation centrale au niveau des réseaux nociceptifs trigéminaux afin de proposer une cible thérapeutique potentiellement intéressante..

16858 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. Dans certaines conditions, les ultrasons peuvent engendrer le passage à l'état gazeux de certaines molécules présentes dans les tissus (eau...) sous forme de nuages de bulles. En fonction de la taille des bulles et des conditions d'exposition, la présence d'un nuage de bulles (cavitation) peut induire des risques (endommager mécaniquement les tissus, induire des échauffements à des endroits non désirés...).

Objectif général : Dans ce contexte, le but de cette étude est de valider la sécurité d'un mode d'application des HIFU en évaluant le risque de dommages involontaires liés à la cavitation lors d'une procédure visant à occlure une veine.

Modèle animal et méthode : L'emploi d'animaux est rendu nécessaire par le fait que la création des nuages de bulles est beaucoup plus facile *ex vivo* (cellules ou organes isolés) et que les bulles, dans ces conditions, ont des caractéristiques différentes, ce qui fausse considérablement l'appréciation des risques encourus chez les patients. De plus, aucun modèle numérique ne s'approche de la complexité nécessaire pour simuler ces phénomènes à l'échelle d'un tissu. L'étude impliquera 9 brebis en aigu.

La première partie de l'étude concernera 3 animaux. Elle visera à démontrer, à l'aide d'un détecteur de cavitation, que les nuages de bulles ne sont engendrés que dans des conditions qui ne se rencontrent que dans la zone focale (zone où l'énergie ultrasonore est la plus concentrée). Ainsi, dans les conditions de traitement, cela permettra de démontrer que les structures environnant la zone ciblée ne peuvent pas être endommagées par ces phénomènes.

La seconde partie de l'étude concernera 3 animaux, elle visera à valider que des pulses unitaires délivrés à une puissance supérieure à la puissance de traitement n'engendrent pas de perforation de la veine ciblée.

La troisième partie de l'étude, concernera également 3 animaux. Elle visera à évaluer si des séries de pulses délivrés à une puissance supérieure à la puissance de traitement peuvent engendrer des perforations de la veine ciblée.

Pour la seconde et la troisième partie de l'étude, l'occurrence de perforation sera évaluée par un examen macroscopique post mortem.

Avant traitement, les animaux seront hébergés en stabulation libre et ne seront pas restreints en eau et en nourriture. Tous les sujets seront anesthésiés durant l'ensemble de la procédure (3R : raffiner) et les traitements seront délivrés sur les deux saphènes latérales et les deux veines fémorales sur chaque sujet, sur l'ensemble de la portion traitable par le dispositif (3R : réduire).

16859 Le diabète est une pathologie chronique majeure, grave, invalidante et en expansion liée à une hyperglycémie c'est-à-dire à un taux de sucre dans le sang trop élevé. 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. Cette hyperglycémie a pour origine une absence de sécrétion de l'insuline (l'hormone qui diminue le taux de sucre) dans le diabète de type 1. Dans le diabète de type 2, il y a un défaut de sécrétion de cette hormone ainsi qu'une insulino-résistance c'est-à-dire que l'insuline n'arrive plus à agir sur ses organes cibles comme le foie et les muscles pour diminuer la glycémie. L'insuline est sécrétée par des micro-organes situés dans le pancréas, les îlots, et plus précisément par les cellules bêta qui représentent 55-70% des cellules de ces micro-organes. La régulation fine de cette sécrétion est nécessaire au maintien du taux sanguin de sucre dans la gamme non pathologique (normoglycémie). Cette sécrétion d'insuline ne dépend pas uniquement de la glycémie, mais également des autres nutriments (acides aminés, lipides), trop souvent négligés dans l'étude des îlots.

Mais si les cellules β des îlots sécrètent la seule hormone capable de diminuer la glycémie, à savoir l'insuline, traiter les cellules β ne suffirait pas. En effet les cellules α , également contenues dans les îlots, jouent aussi un rôle. Le glucagon qu'elles sécrètent augmente la glycémie, ce qui aide à combattre

les hypoglycémies. Cependant chez les diabétiques cette hormone est en excès participant ainsi à la dérégulation du taux de sucre en favorisant les hyperglycémies.

La régulation du taux sanguin de sucre repose donc sur l'action de l'insuline et la contre-régulation médiée par le glucagon.

Des travaux récents suggèrent que le rôle des cellules α est toutefois plus complexe que ce rôle de contre-régulation. Les cellules α libèrent en effet des molécules qui influencent la sécrétion d'insuline par les cellules β . Les cellules α et β agiraient ainsi en synergie pour « combattre » l'hyperglycémie. Dans ce contexte d'interactions fonctionnelles entre ces 2 types cellulaires, l'influence d'autres nutriments que le sucre, comme les acides aminés (AA) et les lipides, pourrait être déterminante et reste à explorer, à la fois *in vivo* et *in vitro*.

Grâce à des souris génétiquement modifiées chez qui on peut supprimer les cellules α après injection d'une toxine, nous pourrions décrire plus précisément l'influence des cellules α sur l'activité des cellules β à la fois *in vitro* et *in vivo*, en réponse au sucre, aux AA et/ou aux lipides dans des concentrations physiologiques, et identifier les facteurs libérés par les cellules α impliqués dans ces communications entre les 2 types de cellules.

Un précédent projet déjà validé par le comité d'éthique prévoyait des expériences *in vitro* de stimulation des îlots avec le sucre (glucose) et, à titre exploratoire, avec des mélanges physiologiques d'AA. La partie *in vivo* de ce projet ne portait que sur la stimulation avec le glucose quant à elle. Or nos résultats *in vitro* montrent une influence majeure des cellules α sur les β en présence de glucose + AA, raison pour laquelle nous adressons une nouvelle demande dans laquelle les protocoles *in vivo* associent le glucose avec les AA et/ou les lipides pour étudier de manière plus physiologique les interactions fonctionnelles α/β .

Pour ce projet, 270 souris maximum seront donc utilisées pour permettre un traitement statistique significatif des données obtenues en se laissant une marge de manœuvre en cas d'échecs. Ces animaux seront 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 à la règle des 3R. Pour le raffinement, leur habitat est enrichi par ajout de dômes et carré de ouate pour la nidification dans toutes les cages.

Ces 270 animaux seront utilisés directement pour différents usages expérimentaux en réponse au glucose/AA/lipides. Les animaux seront conservés après les tests, et leur état de santé suivi afin de leur apporter un traitement adapté si besoin : analgésie, antalgie. Après ces procédures, afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, un prélèvement d'organes pourra être effectué sur ces mêmes animaux.

Si l'état des animaux le permet, afin de réduire le nombre utilisé, certains pourront être utilisés pour plusieurs tests, au maximum 9 lots de 30 souris seront nécessaires mais si cela est possible, la moitié pourrait suffire pour cette procédure. Cette procédure ne peut être faite que sur l'animal entier car la régulation de la glycémie implique plusieurs organes et est liée à toute une série de réponses biologiques non reproductibles intégralement *in-vitro* car aucune lignée cellulaire ne permet de reproduire le rôle des îlots pancréatiques, nous ne pouvons donc pas remplacer l'utilisation de animaux.

16860 Contexte scientifique :

Notre équipe travaille sur un cancer du sang (leucémie aiguë myéloblastique). Nous avons identifié *in vitro* de nouvelles cibles thérapeutiques pour cette maladie qui tue chaque année plusieurs milliers de personnes en France. A l'heure actuelle (2018) 3500 nouveaux cas/an sont détectés et la survie à 5 ans est de 10%.

Description des objectifs du projet :

L'objectif de ce projet est de valider *in vivo*, les inhibiteurs de ces nouvelles cibles dans le développement de cette leucémie. Si cette étude préclinique fonctionne, les traitements utilisés pourront être transférés aux patients. De plus, la plupart de ces traitements sont déjà utilisés dans d'autres pathologies et ont de ce fait une autorisation de mise sur le marché.

Nos études *in vitro* se sont montrées très prometteuses. Nous avons à notre disposition un modèle de souris fortement immuno-déprimées qui nous permet de reproduire la pathologie humaine en greffant des cellules de patients à ces souris.

Par injection intraveineuse nous pouvons induire la leucémie, la suivre par imagerie et simple prise de sang, traiter et soigner les animaux avec de nouveaux médicaments. En termes de modalité technique, nous disposons d'un système d'imagerie performant permettant de suivre l'évolution de la pathologie chez les animaux. Cela nous permet d'évaluer les phases précoces du développement de la maladie dans le but de diminuer la souffrance des animaux.

En faisant appel au modèle murin, les résultats des études *in vitro* et *ex vivo* vont apporter la preuve de concept nécessaire aux étapes précliniques.

Dans le respect de la règle des 3R :

1) Réduire : Nos études *in vitro*, nous ont permis de nous concentrer sur des molécules efficaces. Nous combinerons nos lots témoins. De plus, nous avons une très bonne connaissance du modèle animal de leucémie que nous utilisons depuis plus de 10 ans. Le nombre d'animaux a été calculé par rapports aux questions posées et au nombre optimal pour valider statistiquement les résultats quantitatifs obtenus. Nous prévoyons d'utiliser des souris pour chaque expérience avec 5 souris par condition, ce qui est le nombre minimal permettant d'obtenir des résultats quantitatifs moyennés et ainsi une interprétation statistique par trois répétitions. En fait, le développement d'une plateforme de modélisation de la niche tumorale nous a permis ces dernières années d'augmenter la part *in vitro* et *ex vivo* ne laissant plus à l'*in vivo* qu'un rôle de validation très réduit mais néanmoins indispensable.

2) Raffiner : Dans le respect de la notion de raffinement et d'éliminer ou de 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.

3) Remplacer : Les mécanismes de développement des leucémies *in vivo* ne peuvent pas parfaitement être reconstitués *in vitro* ou *ex vivo*. En effet, *in vitro* les cellules responsables de la prolifération des cellules tumorales ne se développent pas suffisamment. De plus, pour valider les cibles thérapeutiques et les mécanismes de résistances à moyen-long termes, le recours aux modèles murins est indispensable. Nous demandons de ce fait 738 souris sur 5 ans.

4) Le projet comporte deux approches. La première concerne la greffe de cellules humaines à des souris immuno-déficientes et la deuxième concerne la mise en place de nouveaux modèles murins en greffant des cellules murines à d'autres souris permettant ainsi de s'affranchir des limites de l'immuno-déficiences.

5) Le nombre d'animaux a été calculé en prenant 5 souris par conditions ce qui fait un total maximum de 738 souris.

16861 Les maladies neurodégénératives sont causées par la mort de neurones, ce qui affecte le fonctionnement du système nerveux de manière chronique et progressive. Pour être efficace, un médicament doit pouvoir atteindre sa cible neuronale et être disponible, et donc actif, longtemps.

Ce projet aura pour objectif de générer des tissus biologiques (plasma et cerveaux entiers) de souris traitées avec deux candidats médicaments pour les maladies neurodégénératives. Pour atteindre la circulation sanguine et être distribué, un candidat-médicament administré par voie orale doit être absorbé par l'organisme, et donc passer à travers le tractus gastro-intestinal. Après son absorption, un candidat-médicament sera distribué vers différents tissus et organes et sera également métabolisé au niveau hépatique. Le profil pharmacocinétique d'une molécule est donc déterminé par plusieurs variables propres aux organismes complexes (ex. métabolisation hépatique, volume de distribution, passage de la barrière hématoïétique). Les modèles *in vitro* et *in silico* ne permettent pas de

reproduire la complexité des processus physiologiques impliqués dans la distribution et la métabolisation des composés.

Ces deux candidats médicaments dérivent d'un médicament utilisé en neurologie clinique. Des données préliminaires (*in vitro*) indiquent que ces molécules ont un profil toxicologique et de sécurité pharmacologique très proche de celui du médicament. Un traitement avec un de ces deux candidats médicaments, en administration unique, ne devrait pas aboutir à des effets indésirables ou de la toxicité.

Le traitement ne sera administré qu'une seule fois (administration unique), par voie intrapériotonéale, ou par voie orale (gavage) ou par voie intra-veineuse. Les prélèvements de tissus biologiques seront réalisés entre 30 minutes et 24 heures après administration.

À cette fin, le nombre de souris utilisées sera de 354 souris SWISS mâles de 8 semaines.

L'étude comporte deux procédures indépendantes, une par composé.

Au cours de ce projet, une attention particulière sera apportée au respect de la règle des trois Rs.

- Pour le Remplacement :

Pour les raisons mentionnées dans la section "justification de l'utilisation des animaux", il ne sera pas possible de remplacer cette étude par des stratégies *in vitro* et/ou *in silico*. Le profil pharmacocinétique est déterminé par plusieurs variables propres aux organismes complexes (ex. métabolisation hépatique, volume de distribution, passage de la barrière hématoépithéliale).

- Pour la Réduction :

La taille des groupes a été déterminée pour assurer un nombre de réplicat suffisant pour cette étude analytique. La finalité de l'étude sera de déterminer les paramètres pharmacocinétiques des molécules, tels que le temps de demi-vie dans le sang et le système nerveux, ou le passage de la barrière hématoencéphalique.

- Pour le Raffinement :

Le projet comprend des procédures visant à améliorer le bien-être des animaux : (i) la présence d'objets d'enrichissement, (ii) le contrôle strict des besoins physiologiques des animaux (accès à l'eau et à la nourriture, condition d'hébergement) pendant et après l'opération, et (iii) le maintien des interactions sociales. Les animaux seront hébergés par deux au minimum (5 au maximum), en cages ventilées, avec accès ad libitum à l'eau et à la nourriture.

Ce projet expérimental correspond à une étude exploratoire pour déterminer le profil pharmacocinétique et de pharmacodistribution de candidats médicaments pour les maladies neurodégénératives.

16862 La piroplasmose est l'une des nombreuses maladies transmises par les tiques. Cette maladie est liée à la multiplication de parasites unicellulaires dans le sang. Les piroplasmes sont des parasites intracellulaires obligatoires. Deux grands genres de piroplasmes existent : *Babesia* (responsable de babésiose) n'infecte que les hématies, tandis que *Theileria* (responsable de theileriose) infecte d'abord les cellules nucléées du sang (lymphocytes, monocytes...) puis les hématies. Ces deux genres parasitaires sont transmis à une très large gamme d'animaux vertébrés (incluant l'homme) par des tiques. Plusieurs centaines d'espèces de *Babesia* et de *Theileria* existent, qui infectent des vertébrés différents et sont transmis par des espèces de tiques différentes.

L'étude approfondie de ces parasites nécessite le passage par la culture *in vitro* pour plusieurs raisons :

- la production de lignées clonales de parasites (pour s'assurer qu'une seule souche parasitaire est étudiée à la fois, l'échantillon de sang pouvant en contenir plusieurs : co-infection),
- la production de parasites en quantité suffisante pour leur étude génétique,
- la production d'une bio-collection de parasites représentatifs de l'espèce,
- l'étude des interactions de ces parasites avec leur cellule hôte, l'hématie.

La culture *in vitro* de ces parasites permet en effet d'étudier le mécanisme infectieux via l'étude *in vitro* des interactions de l'agent pathogène avec sa cellule cible (hors partie immunitaire) et évite de réaliser

des infections sur animaux. Nous avons déjà démontré que la sensibilité d'un animal à ces parasites est corrélée à leur capacité à envahir ses hématies.

La culture de ces parasites nécessite donc l'accès à du sang d'animaux compatibles avec l'espèce parasitaire étudiée car les différentes espèces de parasites infectent des hôtes vertébrés différents.

Pour la piroplasmose équine, dont les agents étiologiques sont *Babesia caballi* et *Theileria equi*, l'accès à du sang de cheval est donc nécessaire à la culture de ces parasites. Ces parasites étant souvent présents en l'absence de symptômes apparents, la sélection de chevaux sains et le contrôle régulier de leur état sanitaire sont essentiels et se fera parmi 6 chevaux issus d'un troupeau résident d'expérimentation.

Pour *Babesia divergens*, *Babesia venatorum* et *Babesia pecorum*, des hématies de mouton sont utilisées afin de les cultiver *in vitro*. Le mouton est une espèce de sensibilité variable à ces parasites, certains animaux (via leurs hématies) sont sensibles, d'autres pas. Le sang de mouton est donc un excellent modèle d'étude *in vitro* des facteurs essentiels au développement des parasites, et donc d'intérêt dans la recherche de cibles vaccinales. Deux moutons sont donc nécessaires comme donneurs de sang, un mouton à hématies sensibles et un mouton à hématies « résistantes », afin d'étudier et de comparer *in vitro* les mécanismes responsables de la sensibilité de l'animal.

Le sang collecté pourra aussi servir à la culture d'autres pathogènes sanguins à transmission vectorielle (*Anaplasma*, *Trypanosoma*, *Bartonella*).

Le recours à la culture *in vitro* et donc à des animaux donneurs de sang est déjà en soi une méthode de remplacement, de raffinement et de réduction. Il remplace l'utilisation d'animaux pour des protocoles infectieux avec euthanasie finale, ce qui était réalisé auparavant avec la gerbille pour *B. divergens* par exemple. Nous avons effectivement démontré que le diagnostic par culture *in vitro* de ces parasites était possible directement à partir d'une prise de sang et que l'étude de la gamme d'hôtes sensibles des espèces parasitaires était possible également *in vitro*, sans recours à l'infection d'animaux. Nous poursuivons toujours la recherche de méthodes alternatives au recours à l'infection de l'animal tout en poursuivant l'amélioration du diagnostic et des connaissances sur ces agents pathogènes pour les animaux.

Les animaux utilisés sont hébergés en conditions contrôlées pour les moutons (bergerie expérimentale), surveillés pour les chevaux (contrôle à chaque prise de sang de leur état sanitaire). Dans les deux cas, les volumes et les fréquences de prélèvements sont physiologiquement compatibles avec la taille de l'animal. Les fréquences de prélèvement sont calculées en fonction de la durée de maintien des hématies à 4°C après lavage (2 mois pour le cheval, 3 mois pour le mouton), le volume prélevé en fonction des quantités requises pour la culture, tout en restant dans des volumes compatibles avec la physiologie de l'animal.

Les prélèvements seront réalisés par des personnes compétentes, avec un animalier expérimenté et une habitude aux conditions de prélèvements qui seront accompagnés d'une récompense alimentaire.

16863 Une épidémie de pneumonies d'allure virale et d'étiologie inconnue a émergé dans la ville de Wuhan (province de Hubei, Chine) en décembre 2019. Cette pneumonie est une maladie infectieuse causée par un virus appartenant à la famille des coronavirus, identifié sous le nom de SARS-CoV-2 et découvert en janvier 2020. Ce nouveau virus est l'agent responsable de cette nouvelle maladie infectieuse respiratoire appelée COVID-19 (pour COronaVirus Disease 2019). Il n'existe pas aujourd'hui de traitement totalement efficace contre la COVID-19, car les symptômes et la gravité de l'infection restent très variables d'un individu à un autre (perte de goût et de l'odorat / troubles digestifs / syndrome grippal / difficultés respiratoires nécessitant l'hospitalisation en service d'urgence avec aide respiratoire).

L'évaluation préclinique de stratégies thérapeutiques dans le cadre de la COVID-19 nécessite la mise en place de modèles animaux pertinents à même de permettre l'infection par le virus SARS-CoV-2 et l'application de médicaments candidats. Le hamster doré, rongeur de petite taille et facile d'accès, correspond à ces critères. Comme déjà décrit dans la littérature scientifique, l'infection au SARS-CoV-2 chez le hamster reproduit l'évolution de la maladie observée chez l'extrême majorité des patients

humains, et induit une pneumonie qui se résout d'elle-même en une semaine environ, avec un pic de perte d'activité physique et de poids aux jours 4-6 de la maladie. Après deux semaines, les animaux sont revenus à leur statut d'origine (récupération complète des animaux) et sont désormais protégés contre une nouvelle exposition au même virus, démontrant la mise en place d'une réponse immunitaire efficace.

L'objectif de ce projet vise à la mise en place du modèle hamster d'infection au SARS-Cov-2 pour permettre d'étudier plus précisément la Covid-19 et sa capacité à se propager et à infecter, afin d'évaluer et de valider une large gamme de stratégies de prévention et de traitements potentiels (par exemple antiviraux, anti-inflammatoires, vaccins, anticorps) avant passage en phase clinique chez l'humain. Ce modèle permettra de mener l'exploration prospective des mécanismes pathologiques induits par le SARS-CoV-2, notamment au travers du suivi des paramètres immunologiques de l'infection et des modifications induites par les différentes stratégies évaluées vis-à-vis de la souche d'origine de SARS-Cov-2 et de ses mutants naturels susceptibles d'induire une pathologie différente. Les rongeurs, hébergés en groupe dans un milieu enrichi, seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Des signes de souffrance incompatibles avec une survie dans des conditions éthiques (perte d'autonomie, douleur ne rétrocedant pas aux traitements analgésiques, ...) qu'ils soient liés ou non à l'expérimentation, constitueront des critères d'arrêt.

Une étude pilote permettra de caractériser le comportement du modèle hamster d'infection au SARS-CoV-2, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans les études ultérieures (réduction) et d'affiner notamment les conditions de préparation, d'hébergement et d'intervention sur les animaux (raffinement). De plus, le modèle hamster permet en première intention d'éviter le recours à des modèles animaux de plus grande taille tels que les primates non-humains (remplacement). Le projet portant sur l'étude la réponse immunitaire de l'organisme dans le contexte de stratégies de vaccination ou de traitement, il est impossible de remplacer l'animal par tout autre modèle ne représentant que partiellement un organisme. Toutefois, des expériences *in vitro* permettent en amont de ne sélectionner que les meilleurs traitements candidats et de réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés. Les conditions de sécurité requises nous permettent de réaliser des études sur un maximum d'environ 150 animaux par mois, avec un total projeté de 4776 animaux au maximum concentré principalement sur les trois premières années du projet, et dépendant principalement du nombre de candidats thérapeutiques ou vaccinaux à tester au total.

16864 La réplication du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) dans l'épithélium cornéen cause la kératite herpétique (KH). La KH est considérée comme la principale cause de cécité infectieuse dans les pays industrialisés. En France, près de 100 000 patients sont atteints de KH récurrentes, avec près de 20 000 épisodes par an.

Chez l'humain, la physiopathologie de la KH commence par une première infection par HSV-1, le plus souvent asymptomatique (dans 94% des cas), mais suivie d'une propagation du virus à travers le système nerveux vers les neurones du ganglion trijumeau (TG), où le virus entre en latence (absence de réplication virale), avec persistance du génome viral pendant toute la vie de l'hôte.

Sous l'influence de divers stimuli (fatigue, stress, fièvre, déficit immunitaire) le virus réactivé, migre dans les sites périphériques via les axones du nerf trijumeau, et se réplique dans les épithéliums périphériques, comme c'est le cas dans la KH.

Les traitements anti-herpétiques actuels inhibent le processus de réplication virale, ce qui réduit la fréquence et la gravité des récives. En revanche, il ne permet toutefois pas d'éliminer complètement les récives et expose au risque de sélectionner des mutants résistants. Bien que les vaccins expérimentaux soient prometteurs contre la phase aiguë de la maladie, ils ne protègent pas contre les événements de réactivation et la persistance du virus. Le rôle du système immunitaire dans le maintien du virus en latence semble évident, mais les mécanismes exacts impliqués dans le contrôle de la balance latence / réactivation ne sont pas connus.

L'humain est le seul hôte naturel de l'infection à HSV-1. Bien qu'il existe des modèles *in vitro* d'infection des cellules par le HSV-1, ces derniers ne sont pas capables de reproduire des événements

biologiques impliqués dans le contrôle de la latence et de la réactivation du virus, notamment le rôle du système immunitaire. C'est pour ces raisons que nous n'avons pas d'autre alternative que d'effectuer nos études sur des modèles animaux murins.

Dans certaines conditions expérimentales, certaines lignées de souris sont sensibles à l'infection par le HSV-1 et le modèle d'étude développé par nos équipes reproduit fidèlement l'histoire naturelle de la maladie observée chez l'être humain, notamment la phase de latence de l'infection.

Notre projet vise à comprendre les mécanismes encore inconnus de la balance latence/ réactivation impliquant des populations de cellules du système immunitaire spécifiques qui infiltrent les sites de réplication et de latence d'HSV-1. La compréhension du rôle de ces populations pourrait permettre le développement de stratégies préventives réellement efficaces contre la KH, mais également d'autres maladies liées à l'infection par HSV-1 (encéphalites, maladie d'Alzheimer associée à HSV-1 et herpès génital, par exemple).

Pour cela, nous avons identifié spécifiquement une population immunitaire pouvant avoir un rôle pathogène ou protecteur dans différentes conditions. Il est essentiel pour nous de pouvoir mener des expérimentations avec des souris déficientes pour cette sous-population immunitaire, avant ou pendant l'infection. Nous étudierons différents aspects de l'infection à HSV-1 dans le modèle d'animaux déficients, notamment leur effet sur la réplication virale, sur la maladie et sur la réactivation virale après la latence. Nous avons estimé que nous avons besoin, au maximum, de 378 souris pour étudier le rôle d'une sous-population de cellules immunitaires spécifiques, que nous avons identifiée comme étant associée à une maladie médiée par le HSV-1 dans notre modèle de souris. Des calculs de puissance statistique ont été utilisés pour déterminer le nombre minimal d'animaux requis pour atteindre la signification statistique du point de vue expérimental, de manière à réduire le nombre d'animaux utilisés. Notre étude déterminera si cette population cellulaire est impliquée dans la protection, ou au contraire l'exacerbation de la maladie lors d'une infection aiguë par HSV-1, la réactivation de la latence.

Cette étude n'inclut pas de procédures invasives et les douleurs des animaux sont réduites au maximum en effectuant toutes les procédures sous anesthésie générale, par des techniciens formés pour toutes les procédures envisagées, qui ont été validées par un vétérinaire. Pendant la phase aiguë de l'infection, les souris reçoivent des analgésiques pour traiter toute douleur potentielle causée. Les souris sont surveillées après toute procédure, pendant la phase aiguë et après la phase aiguë. Pendant ce temps, une surveillance quotidienne des souris est effectuée.

16865 Les infections mammaires des bovins sont fréquentes en élevage, elles sont responsables de pertes économiques qui fragilisent les exploitations agricoles et altèrent le bien-être des animaux. Il existe deux types de mammites, les mammites clinique ou aiguës qui présentent des signes inflammatoires importants au niveau de la glande mammaire et les mammites subcliniques qui ne sont pas visibles mais qui modifient la qualité du lait.

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 globules blancs (lymphocytes, monocytes, neutrophiles) des bovins laitiers en fonction du statut infectieux de l'animal.

Ces études nécessiteront de prélever du sang sur des vaches laitières infectées élevées en conditions conventionnelles. Un nombre de donateurs de sang suffisant pour la réalisation des travaux tout en évitant une fréquence élevée de prises de sang sera prévu. 40 animaux seront concernés sur la période de 5 ans. Cette période est nécessaire pour obtenir un nombre suffisant d'animaux infectés.

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 : 40 vaches Prim'Holstein (20 cas de mammites cliniques, 20 subcliniques) seront suffisantes pour obtenir un nombre d'échantillons de sang statistiquement acceptable.

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.

16866 Le but de ce projet est de fournir des preuves précliniques qui identifieront la pertinence de la phosphodiesterase de type 9 (PDE9) en tant que cible thérapeutique dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), une maladie grave et incurable.

La physiopathologie de l'HTAP se caractérise par des changements des caractéristiques de la paroi des petites artères du poumon. Ceci rend plus difficile le travail du ventricule droit du cœur. La défaillance progressive de celui-ci conduit finalement au décès.

Les phosphodiesterases (PDEs) sont des enzymes qui jouent un rôle dans de nombreuses fonctions de l'organisme. Les PDEs modèrent la réponse cellulaire à certaines stimulations neuro-hormonales en hydrolysant des molécules-messagers à l'intérieur de la cellule, appelés nucléotides cycliques. L'utilisation de médicaments, dont des inhibiteurs de la PDE de type 5, permettent d'augmenter les niveaux intracellulaires d'une de ces molécules, le guanosine 3', 5'-cyclique monophosphate (GMPc) dans les cellules des parois artérielles. Ceci s'oppose à certains mécanismes participant à la progression de l'HTAP. Ces traitements médicamenteux sont efficaces sur les symptômes cliniques de l'HTAP. Cependant l'efficacité de la prise en charge de l'HTAP reste insuffisante et la seule voie curative reste la transplantation pulmonaire. Ce besoin persistant de nouvelles solutions thérapeutiques nous motive dans la recherche de cibles moléculaires complémentaires.

La PDE9 est une enzyme qui dégrade spécifiquement le GMPc, de manière très sensible. Elle est longuement restée peu documentée dans la circulation. Si la PDE9 se révèle être un acteur de la régulation du GMPc dans la circulation pulmonaire, alors elle pourrait être considérée en tant que cible thérapeutique dans le traitement de l'HTAP. Ayant montré de manière préliminaire que la PDE9 est exprimée dans l'artère pulmonaire de patients HTAP, nous proposons que l'inhibition de la PDE9 serait un moyen efficace pour limiter les processus clés du développement de l'HTAP. La caractérisation poussée du rôle de la PDE9 dans l'HTAP reste cependant un prérequis nécessaire au développement d'éventuelles stratégies thérapeutiques. Nous nous fixons ainsi comme objectif de mettre en évidence le rôle potentiel de la PDE9 dans le développement de la pathologie.

Pour cela, des modèles de cultures primaires de cellules vasculaires issus de ressources biologiques cliniques seront utilisées. Néanmoins, l'utilisation complémentaire d'un modèle *in vivo* pertinent est absolument nécessaire pour comprendre le rôle joué par la PDE9 dans la physiopathologie de l'HTAP : en effet, il est actuellement techniquement inenvisageable de reconstituer les caractéristiques hémodynamiques et histologiques de l'HTAP à l'aide d'un modèle autre qu'un organisme entier. De plus, le maillage d'interactions entre les différents types cellulaires impliqués dans l'HTAP n'est pas suffisamment modélisable par des techniques de culture cellulaire ou par des expériences sur organes isolés.

Pour répondre à la question du rôle potentiel de la PDE9 dans le développement de l'HTAP, des souris génétiquement déficientes pour le gène codant la PDE9 (Pde9a^{-/-}, "knockout »), ainsi que leurs congénères "sauvages" Pde9a^{+/+}, seront soumises à un modèle expérimental d'HTAP. Ce protocole permettra de mettre en lumière l'importance de la PDE9 sur le développement de la pathologie. Dans l'objectif de préparer l'évaluation thérapeutique de l'inhibition de la PDE9 dans l'HTAP, il sera aussi intéressant d'examiner si la suppression de l'activité de la PDE9 peut potentialiser les effets d'autres thérapies de l'HTAP. Ainsi, des groupes expérimentaux recevant des traitements médicamenteux approuvés (inhibiteurs de PDE5 par exemple) seront inclus à l'étude.

L'HTAP sera induite en soumettant les animaux à une hypoxie chronique associée à l'injection d'un produit, le SU5416. Cette combinaison représente à ce jour le meilleur modèle décrit chez la souris pour induire une HTAP aux caractéristiques les plus proches de celle rencontrée chez l'humain. L'élevage en chambre hypoxique pendant 3 semaines est compatible avec le maintien des conditions standard du bien-être animal. La santé et le bien-être des animaux feront l'objet d'une évaluation

quotidienne. Des indicateurs de la souffrance seront quantifiés, et l'euthanasie de l'animal sera considérée si les valeurs atteignent une limite prédéfinie.

La fonction cardiaque sera suivie de manière non-invasive par échocardiographie au cours de la période de réalisation du modèle.

Au terme du protocole d'exposition à l'hypoxie et au SU5416 (après 3 semaines), l'établissement final de l'HTAP sera évalué par mesure hémodynamique invasive réalisée sous anesthésie générale. Cette procédure permet d'établir la présence et la sévérité de l'HTAP induite chez l'animal. A la suite de cet enregistrement, le prélèvement des tissus (cœur, poumons) sera effectué pour permettre leur analyse. Ce prélèvement rapide des organes sur l'animal profondément anesthésié assurera la préservation l'intégrité du tissu *in situ* et permettra de conduire *in fine* une analyse pertinente et utile.

L'application de la règle des « 3R » sera scrupuleusement suivie à tous les stades du projet. L'effectif (170 au total) a été minutieusement défini afin de réduire la taille des groupes tout en garantissant une puissance statistique acceptable. Un lot d'animaux a été prévu pour permettre au personnel de se former préliminairement aux procédures. L'utilisation des organes de chaque animal sera maximisée, de manière à éviter la répétition de la procédure et *in fine* permettra de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Les procédures invasives seront réalisées sur animaux sous anesthésie gazeuse.

Ce protocole permettra de définir de manière robuste si l'absence de PDE9 dans les souris PDE9 (-/-) confère une protection vis-à-vis de la progression de l'HTAP. Nos résultats indiqueront l'intérêt d'un ciblage de la PDE9, en complément d'autres traitements approuvés de l'HTAP. La mise en évidence de la PDE9 en tant que cible thérapeutique potentielle dans l'HTAP ouvrira la voie à une évaluation de l'efficacité des inhibiteurs de cette enzyme sur la pathologie.

16867 Les dysferlinopathies sont des maladies neuromusculaires qui sont dues à des mutations dans le gène codant pour la dysferline, protéine impliquée dans la réparation membranaire. Notre équipe a développé et caractérisé une souris transgénique n'exprimant pas de dysferline. Ces animaux développent des anomalies tissulaires histologiques vers l'âge de 3 mois et les premiers signes de myopathies sont observables vers l'âge de 6-8 mois.

Notre projet est une étude préliminaire dont l'objectif est de tester l'impact d'une nouvelle approche thérapeutique sur les lésions musculaires observées par histologie, avant l'apparition des signes cliniques. Pour cela, nous utiliserons 40 animaux, âgés de 6-8 semaines. Ces souris recevront l'agent thérapeutique par injection intramusculaire réalisée sous anesthésie générale gazeuse.

Notre projet est en cohérence avec le concept des 3R:

- Remplacer: des études *in vitro* prometteuses ont été réalisées en amont de ce projet. Le passage aux tests *in vivo* est maintenant nécessaire pour valider l'impact de cette approche thérapeutique sur le phénotype musculaire.

- Réduire: nous avons réalisé une étude statistique pour déterminer le nombre minimum d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats fiables et statistiquement significatifs.

- Raffiner: nous avons choisi de traiter des animaux jeunes et de tester l'efficacité de notre approche au niveau histologique et moléculaire avant que des signes cliniques ne soient apparus et provoquent une détérioration de la vie des animaux. Afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture *ad libitum*, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Les animaux seront observés quotidiennement suite aux injections. L'apparition de signes de boiterie liée à l'injection, l'animal sera sorti de l'étude et la douleur sera prise en charge médicalement. En cas de persistance de la douleur, l'animal sera mis à mort.

16868 Des variants pathogènes dans le gène KCNQ2 provoquent une épilepsie dans l'espèce humaine. Cette épilepsie se manifeste par de fréquentes crises survenant durant les tous premiers mois de vie (avant l'âge de 3 mois). Cette activité épileptique est accompagnée d'une détérioration des fonctions cognitives et motrices. Il n'existe pas de traitement et les anti-épileptiques classiques sont inefficaces.

Nous étudions une souris modèle knock-in porteur d'un variant récurrent du gène KCNQ2 (T274M). La souris hétérozygote pour ce variant reproduit les caractéristiques principales de la maladie humaine.

Le modèle va nous permettre de mieux comprendre la pathophysiologie de la maladie et de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Pour l'hébergement du modèle, les cages avec de la litière propre, enrichies avec un dôme en carton, sont placées dans un environnement calme avec un maximum de 5 souris adultes par cage. L'eau et la nourriture sont fournies ad libitum. Nous surveillons quotidiennement nos animaux pour détecter tout comportement anormal. Nous veillons à respecter la règle des 3Rs.

Remplacement: aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet. Le passage par un modèle vivant est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique pédiatrique.

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 suffisant. Raffinement: l'hébergement est adapté aux besoins physiologiques des animaux et permet l'expression de leur gamme normale de comportements.

Cette étude utilisera 600 animaux au total pour une période de 5ans.

16869 L'objectif de cette étude est de mesurer l'effet potentiellement analgésique de la mépyramine, un antihistaminique de première génération, dans les douleurs physiologiques et inflammatoires. Ces effets ont été préalablement démontrés par des approches *in vitro* lors d'enregistrements électrophysiologiques sur des neurones sensoriels isolés de souris. D'autre part, sur des préparations nerf-peau chez la souris, nous avons montré que la mépyramine inhibe l'activité des récepteurs sensibles à des stimuli mécaniques ou thermiques et des nocicepteurs qui innervent les couches superficielles de la peau, suggérant l'effet analgésique de la mépyramine dans la réponse à la douleur. 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 sauvages et testerons leurs réponses comportementales à des tests de douleur dans des conditions normales, algogènes et inflammatoires. Les résultats seront comparés avec ceux issus de souris n'ayant pas reçu de traitement à la mépyramine (témoin) et ceux issus de souris ayant reçu un traitement à la lidocaïne, un anesthésique local connu. Pour réaliser ce projet, 204 souris seront utilisées afin de pouvoir comparer les conditions testées à l'aide d'un test Anova et 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 l'effet analgésique de la mépyramine a été démontré *in vitro* chez la souris. La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respecté : réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats, définition précise des points limites et surveillance adaptée des animaux pour éviter leur souffrance et enfin enrichissement de l'environnement des animaux avec des dômes en carton et stabulation des animaux à raison de 6 par grande cage. Les procédures utilisées étant des protocoles de douleur, l'administration d'analgésique (buprénorphine) se fera uniquement en cas de point limite. Les expériences de comportement ont été choisies afin de limiter au maximum la contention de l'animal (animal libre de ses mouvements). Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal. Cette étude permettra d'identifier potentiellement la mépyramine comme un anesthésique local permettant d'être utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ou de l'arthrose.

16870 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 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. Le modèle animal employé ici est la souris DMD mdx. Il s'agit d'une souche de souris modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne ou myopathie de Duchenne.

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 140 souris mdx seront utilisées. Ce nombre se répartit comme suit : 24 lots de 5 souris qui auront les différentes formulations, deux lots de 5 souris servant de contrôle et enfin deux lots de 5 souris non injectées. Ce protocole est composé de 4 procédures.

L'administration se fait sur les deux membres postérieurs de la souris. 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, une imagerie par résonance magnétique (IRM) sera réalisée sur chaque souris à la fin de la procédure.

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. De plus, le nombre d'animaux pourra être revu à la baisse selon les composés retenus. 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.

16871 Le programme de la thèse a comme objectif d'évaluer l'impact d'une exposition aux mycotoxines avec ou sans additif alimentaire (à base de microorganismes vivants ou de fractions microbiennes) sur la réponse immunitaire du jeune ovin pendant les dernières semaines d'allaitement et après sevrage. Dans ce travail, nous évaluerons également les effets sur le microbiote ruminal dont le rôle modulateur du système immunitaire a été souligné.

La règle des 3R a été prise en compte durant toute la durée d'élaboration du projet, 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 (paragraphe statistique). Troisièmement, tout est mis en œuvre pour raffiner les procédures expérimentales en utilisant par exemple un dispositif pour faire des mesures d'ingestion individuelle en lot. Dans ce projet 60 animaux seront utilisés. En raison de l'absence de données concernant les effets des mycotoxines sur le système immunitaire, 2 essais préliminaires ont été réalisés sur un effectif réduit d'animaux pour une mise au point méthodologique.

Les essais préliminaires nous ont permis de valider la dose utilisée et de sélectionner les paramètres pertinents à suivre. Compte tenu de l'importante variabilité individuelle observée dans le dosage des marqueurs de l'immunité, mais aussi en termes de profils métabolomiques nécessitant l'utilisation de plusieurs observations, un nombre de 15 animaux par lot est l'effectif minimum pour détecter des différences entre les lots.

16872 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 du projet 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 au maximum 144 souris males CD1 seront nécessaires. Le nombre d'animaux a été choisi pour un nombre maximal de n=12 souris par groupe de traitement et avec la répétition de 3 modèles animaux pour obtenir le matériel biologique (échantillons tissulaires nécessaire pour les analyses biologiques et anatomopathologiques ultérieures) prélevé aux temps 1, 2 et 3 semaines après le début du traitement.

Pour l'ensemble des expérimentations envisagées, la règle des 3R sera appliquée afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (nombre maximal d'animaux utilisé 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 associé à de la douleur neuropathique, les choix des doses d'anticancéreux ont été validé 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 présenté par les patients en clinique, c'est-à-dire l'administration 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, hérissément 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 nerveux) et de sang pour des analyses ultérieures et dans l'objectif d'exploiter au maximum les modèles animaux réalisés.

16873 (FERMITIN FAMILY HOMOLOG 2) est un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer. Les techniques de culture cellulaire utilisant des cellules neuronales nous ont permis de déterminer le rôle de FERMT2 sur le développement de la maladie d'Alzheimer. Chez l'humain atteint de la maladie d'Alzheimer, le premier marqueur que l'on peut suivre est l'Abeta 40 et l'Abeta 42. Aussi afin d'approfondir les résultats obtenus nous allons développer un modèle de souris Femt2APP. Dans ce modèle le gène FERMT2 sera inactivé dans les cellules neuronales et nous permettra de déterminer le rôle de ce gène dans le développement de la maladie d'Alzheimer. APRES DES ETUDES *IN VITRO*, CETTE ETUDE *IN VIVO* portera sur 1680 souris POUR LES ASPECTS EXPLICITES CI DESSOUS QUI NE PEUVENT ÊTRE ETUDIÉS *IN VITRO*.

Ces souris vieilliront et seront sacrifiées à partir de 4-6 mois et de 10-11 mois. Afin de respecter la règle des 3Rs nous travaillerons sur les 2 sexes. Pour réduire le nombre, nous effectuons sur un hémisphère les analyses immunohistologiques et sur le second les extractions d'ARN, de protéine. Pour toute procédure invasive ou terminale nous utiliserons des analgésiques afin d'éviter toute douleur inutile aux animaux. Chaque procédure impliquée dans ce projet a un point limite défini au préalable afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux. Les animaux inclus dans ce projet sont observés régulièrement afin de vérifier l'absence de signes de souffrance (perte de poids, piloerection, dos rond, démarche anormale, pâleurs des extrémités, automutilation, isolement, léthargie, vocalisation anormale, ...).

Conformément aux nouvelles directives, pour l'hébergement des animaux dans toutes les cages nous avons mis des maisons à souris afin de limiter le stress. De plus afin de s'assurer du bien-être des animaux, leur état sanitaire est surveillé par des contrôles réguliers.

16874 Le domaine d'expertise de notre unité de service est centré sur la caractérisation et l'étude fonctionnelle des populations du système immunitaire murin en conditions normales et inflammatoires. En tant que prestataire de services, nous réalisons ces études pour des laboratoires partenaires publics ou privés. L'effort de recherche de nos partenaires actuels est principalement tourné vers la compréhension du mode d'action de molécules impliquées dans la régulation du système immunitaire et dans la production de cytokines inflammatoires dans le contexte de maladies virales chroniques ou du développement de tumeurs.

L'objectif du projet attendant à cette demande est d'étudier la réponse immunitaire innée après son activation par traitement au PolyInosinic: polycytidylic acid ou Poly(I:C). Le Poly(I:C) est une molécule synthétique mimant une structure double brin d'ARN viral, reconnu notamment par le Récepteur Toll-Like3 (TLR3). Cette reconnaissance va induire l'activation du système immunitaire inné et la production de cytokines inflammatoires (notamment interférons de Type I : IFN α/β), ainsi que la production de molécules immunorégulatrices (IMR). Certains de ces IMR sont d'ores et déjà utilisés comme cibles d'anticorps à visée thérapeutique dans le traitement de certains cancers tel que le cancer de la peau de type mélanome.

Comprendre le mode d'action de ces molécules et leur potentiel impact sur l'activation des populations du système immunitaire inné et sur la sécrétion de cytokines associées à cette activation, serait une réelle avancée dans l'optique de traitements thérapeutiques contre de nombreux autres cancers ou maladies virales chroniques.

Pour ce faire, nous utiliserons des lignées de souris génétiquement modifiées (pour les IMR cibles sélectionnés), préalablement générées par nos laboratoires partenaires. Après induction de l'inflammation par le Poly(I:C), nous réaliserons la caractérisation des différentes populations du système immunitaire (également appelé Immunophénotypage) de ces lignées mutantes pour étudier l'impact de chaque IMR sélectionné sur le fonctionnement du système immunitaire inné. Les cohortes de souris génétiquement modifiées seront soit produites au sein de notre animalerie de statut sanitaire SOPF, soit produites par nos laboratoires partenaires puis exportées dans notre animalerie.

Pour chaque lignée caractérisée, nous réaliserons deux expériences séparées pour chacun des génotypes : Contrôle (CTRL), mutant (MUT) hétérozygote (HET) et MUT homozygote (HOM). Dans la première expérience « Etat basal », nous testerons s'il existe un effet de la mutation lié au sexe en caractérisant 3 mâles et 3 femelles de chaque génotype (CTRL, MUT HET, MUT HOM), soit 18 souris. Dans la deuxième expérience « Etat inflammé », nous testerons l'état inflammatoire des souris après injection de l'anti-CD3 ϵ murin en caractérisant 3 souris par génotype (9 souris au total), soit de sexe mâle, soit de sexe femelle mais de même sexe entre CTRL et MUT afin de s'affranchir de potentiels effets additifs des variations (celles liées au sexe et celles liées à l'inflammation). De plus, les souris CTRL et MUT seront de même fond génétique, ce qui permettra, après inflammation, d'éliminer les variations liées au fond génétique pour ne relever que les variations liées à l'inflammation pour la mutation étudiée.

Nous réaliserons, au maximum, l'immunophénotypage de 25 lignées par an, soit un recours à 675 souris par an. Au cours des cinq années de cette demande, un maximum de 3375 animaux seront utilisés.

Les souris seront âgées de 8 à 10 semaines et devront peser au minimum 20g au début de l'expérimentation.

Aucune altération physique due à l'injection de Poly(I:C) n'a été rapportée pour une injection unique de la molécule par voie intrapéritonéale, à la dose utilisée (10µg/souris) et pour une procédure expérimentale de courte durée (12 heures maximum).

Tout au long de la procédure expérimentale, nous mettrons en place et respecterons la règle des 3Rs.

Concernant le principe de « Remplacement », dans ce modèle il n'est pas envisageable d'utiliser une méthode alternative et/ou substitutive. En effet, nous devons nous placer à l'échelle de l'organisme entier pour caractériser l'impact des IMR sur la réponse immunitaire dans un contexte inflammatoire où toutes les boucles de régulations doivent être présentes.

Concernant le principe de « Réduction », les méthodes de standardisation développées au sein de notre laboratoire nous permettent de réduire le nombre d'animaux tout en ayant des résultats statistiquement significatifs. Cette standardisation est caractérisée par l'utilisation d'automates et d'instruments de mesure calibrés ainsi que d'outils d'analyse automatisés limitant les variations liées aux manipulateurs. En se basant sur ces procédures standardisées, le bio-informaticien de notre service a ainsi déterminé un calcul de puissance nous permettant de définir le minimum de souris nécessaires pour caractériser les différentes populations d'intérêt pour chaque mutation étudiée et chacune des conditions testées (« Basal » ou « Inflammé »).

De plus, si les cohortes générées par les laboratoires partenaires le permettent, jusqu'à deux lignées de souris génétiquement modifiées pourront être traitées avec un même groupe de souris contrôle, réduisant ainsi le nombre de souris utilisées par expérimentation.

Enfin, pour ce qui est du principe de « Raffinement », les souris seront hébergées par groupe de 5 au maximum, l'aliment et l'eau seront distribués ad libitum et les cages seront systématiquement enrichies par l'ajout de plusieurs éléments :

- une maison en carton ou « Safe Hut » (Safe) pour leur procurer un abri,
- un bâtonnet de papier ou « Enrichment Diamond Twists » (Envigo), que les souris pourront grignoter afin de se confectionner un nid
- des carrés de coton qui seront systématiquement ajoutés dans la cage des animaux pour le confort des animaux durant la nuit qui suivra l'injection de Poly(I:C).

Un temps d'adaptation d'une semaine sera également respecté entre la réception des animaux et le début du protocole expérimental. Les souris seront observées quotidiennement par le personnel de zootechnie formé et qualifié et des points limites seront préalablement établis.

16875 Dans le cadre de la production et de la réalisation de contrôles qualité de ses produits (vaccins et sérums), la société doit disposer de réactifs issus de prélèvements de tissus sur animaux, lorsqu'il n'existe aucune alternative de produits de synthèse.

Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits fiables et conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur, d'autre part, d'assurer la production de vaccins conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication et enfin, d'obtenir la mise sur le marché de nouveaux vaccins répondants aux enjeux de santé publique.

Les prélèvements réalisés sur les animaux sont des prélèvements de sang. Le sang est ensuite retraité et permet, selon le besoin, d'obtenir du plasma, du sérum, du sang total non coagulé ou des globules rouges. Le sang sert à fabriquer ou à contrôler les vaccins. Les animaux donneurs peuvent être immunisés au préalable afin d'obtenir du sérum hyper immun, nécessaire au contrôle de certains produits.

Lorsqu'une immunisation est nécessaire, les animaux reçoivent des injections d'antigènes (équivalent à des vaccins) ce qui provoque chez eux une réaction immunitaire et donc la production d'anticorps. Ces anticorps sont ensuite présents dans leur sérum obtenu après un prélèvement de sang.

Le nombre d'animaux concernés pour toute la durée du projet (5 ans) est de 80 ovins, 6 équins, 30 oies, 80 dindes et 1500 poules domestiques. Le choix de l'animal (espèce, âge) est déterminé par l'utilisation du réactif. Il existe toujours une spécification technique entraînant le choix. Les niveaux de souffrance sont légers ou sans réveil pour les animaux non immunisés, léger ou modérés pour les animaux hyperimmunisés.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : Lorsque l'état de la science et les autorités de santé le permettent, les tissus d'origine animale sont remplacés. Le remplacement n'est à ce jour pas possible pour les produits concernés par ce projet.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est limité au minimum, de façon à répondre à la demande de façon optimum. Une sensibilisation des utilisateurs finaux est réalisée, afin d'éviter tout gaspillage de réactif. Dans le cas de la production de sérums hyper immuns sur ovins un prélèvement terminal est envisagé afin de recueillir une grande quantité de sérum, limitant ainsi le nombre d'animaux nécessaire. Dans ce cas, une anesthésie puis une euthanasie sont réalisées.

Raffinement : Les quantités de sang prélevées sont toujours inférieures aux recommandations réglementaires. Les prélèvements sur poules domestiques sont terminaux. Les animaux sont placés sous anesthésie générale profonde et la récolte du sang est maximisée. L'animal est ensuite euthanasié par une injection létale d'un produit homologué. Les animaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Les prélèvements sont réalisés sur animaux en parfaite santé.

16876 Les sons environnementaux, de parole, de musique et même la plupart des bruits industriels et de loisirs naturels ont pendant longtemps été caractérisés par leur énergie moyennée pendant le temps d'exposition (supposé 8 h, le temps de travail légal quotidien), sans tenir compte particulièrement de la manière dont cette énergie est distribuée dans le temps, mais partant de l'observation empirique que l'intensité instantanée varie beaucoup d'un instant à l'autre, et que le spectre de fréquences est également très variable.

Depuis quelques années, ce n'est plus vrai. La télévision, la radio, les services de streaming ainsi que les concerts de musique utilisent une technique bien connue du traitement du son : la compression. Le but de la compression est de faire correspondre la gamme dynamique naturelle d'un signal à une gamme plus petite. Du fait de cette réduction du contraste il n'y a pas de pauses ou de micro pauses dans le temps. L'avantage de la technique est que le son produit domine les autres sources sonores en compétition et reste audible en toutes circonstances même dans les lieux bruyants. L'inconvénient dont se plaignent de plus en plus d'utilisateurs est la disparition totale de pauses réparatrices, même brèves, pendant lesquelles le système auditif se repose ou récupère.

La justification du présent projet est que les bases scientifiques disponibles quant à la réponse du système auditif à des sons très intenses indiquent que ce système ne peut ni se protéger (par des voies réflexes, par exemple) ni se restaurer (par des voies métaboliques permettant d'éliminer les substances toxiques produites par l'exposition ou de rétablir l'homéostasie des cellules sensorielles et neurones auditifs) lorsque le son intense, même présenté à une énergie jugé conforme, ne ménage plus aucune pause.

Le plus inquiétant est le fait que dans les concerts et les festivals, les temps d'exposition à la musique compressée à niveaux d'intensité maximums tolérés par la loi varient de 2 à 12 heures. En cas de fatigue ou faillite temporaire des systèmes de protection naturelle de l'audition, les auditeurs qui se croient protégés sont en fait en danger.

Étant donné qu'on ne sait pas si l'exposition à la musique compressée peut causer des dommages réversibles ou irréversibles à l'audition, l'utilisation d'animaux dans ce projet est indispensable pour apporter une preuve de concept avant toute mesure chez l'homme exposé. Le cobaye (cochon d'Inde, *cavia porcellus*) est un animal dont la gamme de sensibilité auditive est très semblable à celle de

l'homme. De plus, il peut être soumis à un protocole de conditionnement qui lui permet d'être testé éveillé, avec une contention minimale, donc sans stress et avec ses réflexes protecteurs actifs, par méthodes audiologiques parfaitement non invasives, identiques à celles utilisées en ORL pédiatrique. L'objectif de ce projet est (1) comparer les effets auditifs d'expositions répétées à des musiques compressée et non compressée de niveaux moyens égaux, (2) comparer les modifications histologiques induites par ces expositions répétées à des musiques compressée et non compressée.

Le minimum d'animaux possible sera utilisé pour avoir des résultats significatifs et prévoir d'éventuelles pertes (présence d'otites d'oreille moyenne qui entraînent des perturbations auditives ou vestibulaires). Au total, 60 animaux seront nécessaires, après estimation à l'aide de la formule de taille d'échantillon. Nous utiliserons 6 groupes de 10 animaux, dont 3 groupes sur une période courte (un groupe témoin non exposé, un groupe d'étude exposé à une musique non compressée, un groupe d'étude exposé à une musique compressée), et trois groupes sur une période longue (un groupe témoin non exposé, un groupe d'étude exposé à une musique non compressée répétée, un groupe d'étude exposé à une musique compressée répétée). Tous les animaux bénéficieront également d'un suivi quotidien dans le but de vérifier les états de stress et leurs cages seront enrichies à l'aide de rouleaux en cartons pour stimuler leur activité. L'évolution en points limites absolus entraînera l'euthanasie de l'animal. A la fin, les animaux de chaque groupe seront sacrifiés afin de procéder à une étude des tissus de l'oreille interne.

16877 Le réseau des ganglions de la base (GB) organise le fonctionnement d'un ensemble de structures cérébrales ayant un rôle crucial dans le contrôle de nos actions motrices quotidiennes. Les modes de fonctionnement exacts de ce circuit pendant un mouvement restent encore méconnus à ce jour. Le dysfonctionnement de ce réseau entraîne des maladies motrices graves qui affectent non seulement la capacité d'initier une action (maladie de Parkinson) ou à l'inverse l'impossibilité de réprimer des mouvements involontaires (dyskinésies). L'objectif principal de ce projet de recherche est de disséquer le rôle des GB à la fois dans l'exécution d'un mouvement normal et dans la genèse des mouvements anormaux. Nous étudierons deux situations pathologiques extrêmes : i) la maladie de Parkinson et ii) l'état dyskinétique. Le projet bénéficiera d'une avancée technologique consistant à manipuler de façon contrôlée, temporaire et réversible à l'aide d'une lumière laser l'activité électrique de populations de neurones ciblés afin d'en définir leurs rôles.

Les GB étant composés de nombreuses sous-populations neuronales, l'objectif principal du projet de recherche est de comprendre l'implication fonctionnelle de chacune d'entre-elles en s'appuyant sur l'utilisation de souris transgéniques. Les souris transgéniques qui seront utilisées permettront de cibler précisément les différentes sous-populations neuronales des GB, inaccessibles chez des animaux non modifiés génétiquement. Ces animaux seront utilisés en condition non pathologique et en condition pathologique reproduisant la maladie de Parkinson chez le rongeur avec ou sans induction de mouvements involontaires. Les expériences planifiées sur ces animaux sont basées sur une approche pluridisciplinaire qui combine manipulations par la lumière laser des neurones et enregistrement de l'activité électrique des neurones *in vivo* en situation comportementale. La tâche motrice que nous utiliserons consiste en un mouvement volontaire de type appui sur un levier et/ou de locomotion spontanée et sur tapis roulant.

L'organisation du projet ainsi que l'ensemble des protocoles expérimentaux s'inscrivent dans le strict respect des fondements éthiques dictés par la règle des 3 'R' (Réduire, Raffiner, et Remplacer). À ce jour, l'obtention de telles données ne peut se soustraire à l'utilisation de modèles animaux, qui ne peuvent pas encore être remplacés par des modèles alternatifs (modélisation, culture cellulaire, coupes de cerveau). L'identification des circuits neuronaux impliqués dans l'acte moteur volontaire requiert la manipulation et l'enregistrement intracérébral des réseaux neuronaux chez l'animal vigile qui ne peuvent pas encore être obtenus à partir de méthodes alternatives. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux a été fixé à 75 individus par groupe expérimental afin d'atteindre la puissance statistique nécessaire et suffisante à la réalisation de ce type d'expérience (en fonction des effets attendus et de la variance de notre échantillonnage). Comme nous souhaitons reproduire ces résultats quel que soit le sexe de l'animal (i.e. mâle et femelle) nous atteindrons 150 animaux par groupe expérimental. Considérant toutes les différentes lignées de souris, le nombre total de souris utilisées

pour la réalisation de ce projet de recherche est de 3900. Finalement, l'ensemble du projet repose sur des critères de raffinement strict. Les expérimentateurs ont tous été formés spécifiquement à la réalisation de ce type de projet et porteront une attention particulière au respect des procédures.

Ces dernières ont été établies afin de (1) limiter la douleur et la traiter si elle ne peut être évitée (utilisation d'anesthésiques et/ou d'antalgiques les plus adaptés à chaque procédure) et 2) prévenir et soulager le stress des animaux en assurant les meilleures conditions de vie aux animaux tout au long du projet. Le bien-être des animaux est notamment assuré par le maintien des conditions de vie en groupes sociaux dans un environnement additionné d'éléments d'enrichissement du milieu. Pour la partie comportementale, les animaux sont manipulés quotidiennement et habitués à la fois aux expérimentateurs et aux dispositifs expérimentaux pour diminuer leur niveau de stress. Les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne, particulièrement renforcée après chirurgie, ou dès que nécessaire. Des points limites précoces ont à ce titre été clairement définis à l'aide d'une grille d'évaluation afin d'identifier précocement toute forme de souffrance et de les prendre en charge rapidement avec des mesures de soulagement adaptées.

16878 Le cancer de la vessie est un des cancers les plus fréquents au monde avec 435 000 nouveaux cas chaque année et 165 000 décès par an. Au diagnostic, 70-80% des cancers de la vessie sont des tumeurs superficielles n'infiltrant pas le muscle vésical (TVNIM). Environ 25% des patients est diagnostiqué d'emblée avec une tumeur profonde infiltrant le muscle vésical (TVIM). Depuis près de 40 ans, le bacille de Calmette-Guérin (BCG), utilisé comme vaccin anti-tuberculeux, est aussi le traitement de référence des tumeurs superficielles de la vessie (TVNIM) à haut risque de progression. Son mécanisme d'action est complexe et partiellement élucidé. Le traitement local par instillations intra-vésicales de BCG a pour objectif de stimuler la réponse immunitaire au sein de la vessie ce qui provoque une réponse cytotoxique contre les cellules tumorales (effet recherché). Malgré ce traitement standard, le risque de récurrence et de progression vers une tumeur infiltrant le muscle est estimé à 30% dans les 5 ans. Finalement, plus d'un patient sur 10 développe finalement des métastases et décèdent de leur maladie initiale. Aujourd'hui, aucun élément clinique ni biologique ne permet de prédire la réponse au BCG, ni même l'évolution métastatique de la maladie.

Afin d'adapter le traitement des patients atteints d'un cancer de la vessie et d'apporter un rationnel scientifique au développement de médicaments innovants, il est indispensable de pouvoir identifier les phénomènes de résistance et l'influence des modifications induites dans le système immunitaire par le traitement au BCG.

Paradoxalement, les résultats de nos études expérimentales ont montré que le BCG pouvait aussi avoir un impact négatif sur les cellules tumorales. Certaines cellules tumorales exposées au BCG pourraient développer des résistances au BCG et devenir plus agressives en acquérant une capacité élevée d'invasion métastatique. Il s'agit d'une découverte récente mise en évidence sur plusieurs modèles *in vitro* (lignées tumorales et tumeurs fraîches humaines) et *in situ* sur une cohorte de tumeur humaines exposées au BCG. Afin de valider notre hypothèse scientifique *in vivo*, le modèle animal reste indispensable pour valider nos résultats et confirmer notre hypothèse scientifique.

Une étude préliminaire *in vivo* par injection sous-cutanée de cellules tumorales n'a pas permis d'évaluer la capacité métastatique de ces cellules exposées au BCG. En effet, le modèle n'étant pas assez proche de la physiopathologie de la maladie intra-vésicale ne permet pas de mettre en évidence la dissémination métastatique à d'autres organes.

L'objectif de ce nouveau modèle murin sera de valider *in vivo* la capacité d'invasion métastatique intra-vésicale acquise après exposition au BCG. In fine, cette étude pourrait permettre d'identifier précocement des patients à haut-risque métastatique en cas de non-réponse au BCG.

Afin de valider notre hypothèse scientifique, nous nous proposons de comparer l'évolution de la tumeur en fonction des modifications cellulaires induites par le traitement au BCG sur un modèle orthotopique, c'est à dire l'implantation des cellules tumorales directement dans la vessie.

La mise au point de ce modèle expérimental est nécessaire avant de pouvoir valider notre hypothèse scientifique. L'implantation de cellules tumorales dans la vessie sera réalisée à partir de la bibliographie existante qui décrit précisément le protocole opératoire.

Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude statistique permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Les techniques de greffe ont été et seront standardisées pour améliorer la reproductibilité des résultats.

Ainsi, ce projet nécessitera un nombre de 210 souris. De manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance à l'aide de complément alimentaire et de traitements anti-douleur adaptés. Toutes les interventions et administrations se feront sous anesthésie générale ou locale. Les points limites établis seront strictement appliqués.

L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien des effets et contraintes liés aux procédures.

16879 Les infections par le protozoaire *Cryptosporidium parvum* sont très fréquentes à travers le monde et conduisent à des pertes économiques importantes chez les ruminants et affectent aussi la santé humaine. Ce parasite se développe dans les cellules intestinales des animaux et provoque des diarrhées pouvant conduire dans certains cas à la mort. Devant l'absence de vaccin (en santé humaine ou vétérinaire) et de traitement efficace, il est nécessaire de rechercher de nouveaux moyens de contrôles visant à renforcer les défenses naturelles des jeunes animaux pour un meilleur contrôle de la cryptosporidiose.

L'objectif de ce projet est de tester l'effet protecteur de différents immunostimulants dans le modèle de souriceau nouveau-né et de décortiquer les mécanismes immunologiques mis en jeu lors de ces traitements. Le modèle souris est très utilisé pour les études fondamentales en immunologie mais également pour les essais de traitement. Les souriceaux développent l'infection et éliminent naturellement le parasite en 3 semaines comme le font les jeunes ruminants. La souris adulte est relativement résistante à l'infection sauf si elle est déficiente pour des composants de la réponse immunitaire. Pour cela, des souriceaux C57BL/6J âgés de 3 à 7 jours sont infectés par voie orale avec le parasite et reçoivent ou non un immunostimulant (par voie orale ou intra-péritonéale) afin d'évaluer sa capacité à réduire l'infection par mesure du nombre de parasite dans l'intestin. Le mécanisme immunitaire mis en jeu dans cette protection sera analysé en réalisant des prélèvements de tissus à la fin de l'expérimentation.

Ce projet sur 5 ans évaluera de nombreux immunostimulants et les mécanismes immunologiques mis en jeu suite à leur administration pour favoriser le contrôle des infections par *C. parvum*. Le nombre d'animaux est estimé pour les 5 ans entre 2160 à 2880 souriceaux et 360 à 480 mères souris adultes (femelles allaitantes) soit 3360 animaux maximum.

Les expérimentations seront menées à bien selon le principe des 3R.

Raffiner : Pour que les mères souris s'occupent bien de leurs petits, du coton et une boîte à oeuf sont introduits dans chaque cage, ainsi la mère fabrique un nid pour sa progéniture.

Réduire : Pour pallier la perte éventuelle de souriceaux due à l'état de stress qui caractérise les souris C57BL/6, plus d'animaux seront mis en reproduction. Les animaux surnuméraires sont toujours utilisés et peuvent être introduits dans un autre protocole. Enfin, les immunostimulants non commerciaux seront tous préalablement validés *in vitro* pour leur capacité à stimuler fortement les cellules immunitaires permettant de réduire ensuite le nombre d'animaux utilisés.

Remplacer : l'étude de l'immunologie de la muqueuse intestinale dans un contexte infectieux ne peut être réalisée sans expérimentation animale. En effet, les études *in vitro* ne tiennent pas compte de la complexité des coopérations cellulaires et de l'environnement intestinal (flore bactérienne et antigènes alimentaires).

Du point de vue statistique, nous utiliserons des modèles statistiques mixtes qui tiennent compte à la fois des facteurs à effet fixe (exemple Infection ou déficience génétique de l'animal ou traitement immunostimulant) et des facteurs à effet aléatoire (répétition des expériences).

16880 Les effets sur la santé des champs électromagnétiques sont sujets à de vifs débats au sein de la communauté scientifique. Chacun de nous est exposé à un ensemble complexe de champs électromagnétiques de faible intensité, tant à la maison que sur le lieu de travail, dont les sources vont

de la production et du transport de l'électricité pour alimenter les appareils ménagers et les équipements industriels, aux télécommunications et aux émissions radiotélévisées. C'est pourquoi le public s'inquiète des éventuels effets sur la santé d'une exposition à ces champs. Les processus de vieillissement sont étroitement liés à un déséquilibre de la balance pro/antioxydants qui s'installe progressivement avec l'âge. Cependant, les effets possibles des champs électromagnétiques sur la balance pro/antioxydant myocardique d'un système vivant ne sont pas encore connus. Dans ce contexte, notre projet vise à caractériser les paramètres électromagnétiques des cellules cardiaques et à modéliser les phénomènes électromagnétiques au niveau tissulaire sur un modèle murin d'exposition aux champs électromagnétiques, par des approches multidisciplinaires afin de fournir des éléments scientifiques pour définir les seuils à partir desquels des effets irréversibles et/ou réversibles sont observés. A ce jour, seul l'animal vivant peut permettre d'évaluer ces paramètres et il n'existe pas à l'heure actuelle de moyens alternatifs. Les bonnes pratiques seront observées tout au long de l'étude, notamment au niveau de la gestion de la douleur. Un suivi journalier par un zootechnicien qualifié de l'animal hébergé dans une zootechnie agréée sera mis en place et des points limites précis seront définis afin de gérer la douleur éventuelle des animaux par l'observation de critères comportementaux, physiologiques, des signes cliniques et zootechniques observés (perte de poids de plus de 20% du poids d'origine, poils hérissés, absence de toilettage, prostration, dos rond, abdomen distendu, dacryorrhée). Le franchissement de points limites entraînera le sacrifice de l'animal. La comparaison statistique de deux groupes se fera par un test T non apparié (dans le cas où les résultats suivent la loi normale). Dans le cas contraire, un test non paramétrique sera utilisé (Mann-Whitney). Pour comparer plusieurs groupes, une ANOVA à une voie suivie d'un test post-hoc de Bonferroni sera réalisée. Dans son ensemble, ce projet, qui comprendra 80 souris, permettra de déterminer et d'évaluer les risques potentiels associés à des expositions aux champs électromagnétiques au niveau du système cardiovasculaire.

16881 L'anaphylaxie se définit comme une réaction d'hypersensibilité sévère et potentiellement fatale en réponse à une exposition à un allergène. L'allergène responsable des réactions anaphylactiques est souvent difficile à identifier lors du premier épisode anaphylactique. Les aliments, les médicaments, les venins d'insectes et l'effort physique sont les principales étiologies retrouvées, ces dernières variant en fonction du lieu de vie et de l'âge du patient.

La prévalence et l'incidence de l'anaphylaxie dans la population générale sont sous-estimées. En effet, cette pathologie est sous-diagnostiquée en raison de la variété des manifestations cliniques. Sa prévalence au cours de la vie est estimée entre 0,05 et 2%.

L'anaphylaxie peut se caractériser par une atteinte cutanéomuqueuse, des voies respiratoires et/ou de la respiration. Les mécanismes physiopathologiques de l'anaphylaxie sont nombreux et polymorphes. Deux types de réactions sont distinguées :

- les réactions non immunologiques : induites par des allergènes et aboutissant à une libération directe de médiateurs inflammatoires.

- Les réactions immunologiques : médiées par les IgE, et évoluant en trois phases. Une première exposition favorise une sensibilisation initiale à l'allergène, induisant une sécrétion d'IgE spécifiques. Leurs fragments Fc se fixent sur les mastocytes et les polynucléaires basophiles. Lors d'une seconde exposition, le même allergène se fixe sur ces IgE, activant ainsi la libération des médiateurs inflammatoires. La troisième phase implique une amplification de la réaction allergique, avec un recrutement de multiples médiateurs de la réaction inflammatoire, responsables de la symptomatologie clinique.

Sans prise en charge adéquate et rapide, l'état de choc anaphylactique est inéluctablement léthal. Les premières mesures reposent sur l'éviction rapide de l'allergène et sur l'administration sans retard d'adrénaline intramusculaire (IM). Bien qu'aucune étude prospective randomisée n'ait prouvé son efficacité, l'adrénaline constitue le traitement de première intention de l'anaphylaxie. Les antihistaminiques n'ont pas de bénéfice sur les atteintes vitales potentielles et constituent de fait un traitement de seconde ligne.

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 2 modèles différents chez la souris. Le premier protocole consiste à créer une anaphylaxie systémique en sensibilisant les souris, par voie intraveineuse, avec des anticorps IgE spécifiques d'un allergène. Les souris seront ensuite mises en contact avec l'allergène en question par voie intraveineuse. Dans le deuxième protocole nous étudierons l'effet de candidats médicaments sur l'anaphylaxie cutanée. Des IgE spécifiques de l'allergènes seront administrés en intra-dermal à la base de l'oreille. Les souris recevront par la suite l'allergène par voie intraveineuse. Ce projet utilisera 560 souris sur sa totalité.

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. Le but du projet étant l'analyse des paramètres inflammatoires, il ne sera pas possible d'utiliser d'anti-inflammatoires ou d'analgésique, la douleur est un signe cardinal de l'inflammation. 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 pourra entraîner l'arrêt immédiat de l'expérimentation. En effet certains critères suffiront à eux seuls à l'arrêt de l'expérience, telle qu'une perte de poids (-15%) ou de température (-2°C) trop importante ou la suffocation de l'animal.

16882 Notre plateforme *in vivo* réalise une palette de prestations très large, allant de la mise à disposition des modèles de maladies métaboliques, telles que le diabète, l'obésité, les maladies inflammatoires du foie comme la NASH (de l'anglais Non alcoholic steatosis hepatitis) à la réalisation d'études sur la nutraceutique (suppléments alimentaires, prébiotiques et probiotiques) selon les besoins du demandeur. Dans ce contexte, la plateforme est amenée à développer des modèles spécifiques pour répondre aux questions scientifiques posées par ses utilisateurs. De ce fait, il est nécessaire de développer un modèle capable de détecter et suivre de manière individuelle différents paramètres, tels que les paramètres métaboliques, comportementaux et physiologiques. Des techniques et équipements très sensibles capables de mesurer la prise alimentaire, la dépense énergétique journalière de chaque animal (individuellement) seront utilisés. Ces mesures peuvent durer de 1 à 12 semaines. Concernant les expérimentations individuelles de longue durée (à partir de 4 semaines), chaque cage aura un enrichissement plus important, comme du nestlet pour garder la chaleur ou mimer un nid, l'igloo pour filtrer la lumière et apporter un abri, l'aspen brick et le tunnel pour l'interaction, la distraction et l'activité.

Les souris étant des animaux sociaux, elles doivent être mises en cage par groupe. Cependant, pour les études avec des analyses métaboliques et/ou du microbiote, un isolement est nécessaire afin que la pertinence des analyses soit fiable. La directive de l'Union européenne (UE) qui régit les soins et l'utilisation des animaux dans la recherche et les essais exige des États membres qu'ils veillent à ce que "toutes restrictions concernant la mesure dans laquelle un animal ne peut satisfaire ses besoins physiologiques et éthologiques sont réduites au minimum".

Néanmoins, les contacts sociaux obtenus par l'hébergement des différents animaux dans des cages adjacentes participent à l'enrichissement. Sachant l'importance que le composant social a pour la science et pour le bien-être animal, les procédures d'enrichissement de l'environnement et de l'expérimentation ont été approuvées par notre équipe SBEA et le vétérinaire référent. L'établissement

de signes cliniques journaliers (comportementaux, tels que l'agressivité et l'apathie ; physiologique, tel que la perte de poids supérieur à 20% du poids d'origine) classés par sévérité, ainsi que la définition et application des points limites permettent de veiller au bien-être des animaux. Selon l'analyse du marché auquel nos potentiels clients peuvent nous demander ce type de prestation, nous avons calculé un maximum de 200 souris durant les 5 ans.

16883 a recherche et le développement de nouveaux médicaments impliquent plusieurs étapes, depuis la découverte de molécules potentiellement thérapeutiques (« drug discovery ») jusqu'à la mise sur le marché d'un médicament. La première étape consiste en une sélection (« screening ») de molécules d'intérêt, qui devront ensuite être testées *in vitro* sur des cultures cellulaires puis nécessairement *in vivo* chez des animaux vivants avant d'être testées en clinique chez l'Homme.

Les tests *in vivo* visent à caractériser les effets et le comportement de molécules candidates après administration chez l'animal. Il est notamment indispensable d'évaluer différents paramètres dont ceux d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME) des molécules car ce sont des éléments cruciaux pour la sélection de candidats médicaments.

Ces analyses ont considérablement amélioré le taux de succès de la recherche et du développement de médicaments ces vingt dernières années pour trois raisons principales : (i) ces études ont été incorporées en routine dès les phases précoces de découverte de nouvelles molécules, (ii) les scientifiques ont une meilleure connaissance des enzymes et des transporteurs impliqués dans le métabolisme des médicaments ainsi que des différences entre les espèces et individus, (iii) des stratégies d'optimisation des propriétés métaboliques et pharmacocinétiques des molécules ont été établies et appliquées à la recherche et au développement de médicaments.

Il existe des modèles cellulaires permettant d'évaluer la cytotoxicité, l'absorption et le métabolisme de molécules *in vitro*. Ces tests permettent d'effectuer un premier criblage de molécules ; cependant, aucun modèle *in vitro* ne peut remplacer complètement un organisme vivant. Il est indispensable de mener ces études dans un modèle animal qui permet d'évaluer des paramètres essentiels comme la clairance, la biodisponibilité, l'exposition, la demi-vie et le volume de distribution d'une molécule suite à son administration chez l'animal. La tolérance des molécules administrées doit également être prise en compte. Ces analyses, qui aident à la détermination de la dose à administrer, doivent être réalisées avant de passer aux études de toxicologie et d'efficacité des molécules. L'ensemble de ces données aident à la prédiction du comportement d'un médicament lors d'une administration chez l'Homme.

Ce projet s'effectuera chez la souris (*Mus musculus*) et chez le rat (*Rattus norvegicus*).

Sur une période de 5 ans, il est prévu d'utiliser 3270 souris et 1335 rats pour l'évaluation de la pharmacocinétique de nouvelles molécules thérapeutiques.

La règle des 3Rs sera appliquée à ce projet selon les modalités suivantes :

- 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*.
- Réduction des animaux : le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé, le nombre d'animaux est réduit à 6 animaux par groupe, nombre minimal pour une analyse statistique des résultats. De plus, le projet inclut, pour une procédure, une évaluation en imagerie non invasive (TEMP/TDM) de la pharmacocinétique de molécules préalablement marquées afin d'appliquer un suivi longitudinal chez l'animal. A terme, cette procédure permettra de réduire le nombre d'animaux.
- Raffinement : Les expérimentateurs sont exclusivement des personnels formés à l'expérimentation animale et maîtrisent les bons gestes garantissant le bien-être animal. Afin de minimiser le potentiel de souffrance et/ou de détresse chez les animaux, une évaluation régulière de points limites sera réalisée. Les points limites établis sont les suivants : défaut d'alimentation et/ou de boisson sur une période de 24 à 48h se traduisant par un amaigrissement et une déshydratation ; perte de poids >20 % du poids normal maintenue sur 72h ; hypothermie persistante, décelée par un animal froid au toucher et réticent à bouger ; difficulté respiratoire, avec augmentation du rythme respiratoire ; faiblesse ou paralysie des membres, se traduisant par des défauts de locomotion. En cas de dépassement, les animaux seront euthanasiés selon la méthode prévue décrite au paragraphe 3.3.3.

Un enrichissement (igloo, tunnel...) sera ajouté dans les cages afin d'améliorer l'environnement et le confort des animaux, et l'utilisation de techniques d'imagerie innovantes non invasives permettront d'optimiser l'expérimentation. Lorsque cela est nécessaire, les procédures seront réalisées sous anesthésie gazeuse par inhalation d'isoflurane.

16884 Thème de recherches : Etude des cellules immunitaires dans l'asthme allergique, suite à l'invalidation *in vivo* du gène d'intérêt.

Mieux comprendre les mécanismes contrôlant les fonctions des cellules immunitaires (lymphocytes T) est un enjeu majeur pour la modulation de la réponse immunitaire à des fins thérapeutiques. Les lymphocytes T effecteurs jouent un rôle critique dans l'établissement et la régulation d'une réponse immunitaire efficace dans le cas d'infections, d'allergies ou au cours du développement tumoral. Dans une étude antérieure nous avons mis en évidence l'implication du gène d'intérêt dans une population de cellules lymphocytaires effectrices comme régulateur de l'immunité anti-tumorale dans le cancer colorectal. Cette population cellulaire joue un rôle prépondérant dans l'asthme allergique et aucun projet montrant l'implication du gène d'intérêt n'a été fait, cela permettrait d'étudier son rôle fonctionnel dans ce processus pathologique fortement dépendant de ces cellules et pourrait donner lieu à de nouvelles voies thérapeutiques. Nous souhaitons pour cela recourir à un modèle murin invalidé pour le gène d'intérêt et exposer ces animaux à des allergènes, afin de mimer des situations d'asthme allergique permettant ainsi d'étudier l'implication de ce gène dans ces processus de réponses immunitaires.

La compréhension des mécanismes responsables de la production et des fonctions des cellules immunitaires est importante pour différentes problématiques de santé publique. Les cellules immunitaires sont produites tout au long de la vie d'un individu de façon continue afin d'assurer leur renouvellement et apportent une réponse adaptée que ce soit en situation d'homéostasie ou pour faire face à des agressions par des agents étrangers. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de recherche qui vise à étudier un nouveau régulateur des cellules immunitaires dans le contexte d'asthme allergique en utilisant un modèle de souris mutantes développé précédemment.

Afin de s'inscrire dans la logique des 3Rs (Réduction du nombre d'animaux utilisés, Raffinement des procédures expérimentales, Remplacement des animaux), chaque procédure expérimentale *in vivo* envisagée, a fait l'objet d'études préliminaires permettant d'optimiser au mieux le nombre d'individus utilisés. Pour préserver au mieux le bien-être animal nous avons défini des points d'arrêt anticipés des expériences et utiliserons systématiquement la plus faible dose d'allergène entraînant une réponse d'asthme allergique. Le remplacement par substitution n'est actuellement pas envisageable, aucun modèle cellulaire *in vitro* ne permet de mener les études proposées, puisque ces mécanismes impliquent des micro- et macro-environnements cellulaires, incluant de nombreux types cellulaires.

C'est pourquoi ce projet de recherche ne peut se faire qu'en utilisant la souris comme modèle d'étude afin de comprendre les mécanismes d'activation des cellules immunitaires en absence du gène d'intérêt en condition d'asthme allergique. Les résultats de ces travaux devraient contribuer à optimiser les traitements chez les patients.

Dans les différentes expérimentations, la détermination sexuelle étant importante, les souris des 2 sexes pourront être utilisés, mais indépendamment. Ces études nécessiteront au maximum l'utilisation de 570 animaux pour l'ensemble du projet. Ce projet est composé de 2 procédures expérimentales visant à étudier, en absence du gène d'intérêt, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'asthme allergique aigu ou chronique.

16885 D'une prévalence de 20-40% de la population dans les pays occidentaux, les maladies hépatiques métaboliques non alcooliques ou « Non Alcoholic Fatty Liver Diseases » (NAFLD) représentent un problème majeur de santé publique à l'échelon mondial avec des centaines de milliers de personnes atteintes de NAFLD en France. L'OMS les catégorise actuellement comme la cause numéro une des maladies hépatiques dans les pays occidentaux car elles peuvent évoluer vers une cirrhose et un cancer du foie (ou hépatocarcinome) avec un taux de survie de 10% sur 5 ans. Même si les NAFLD sont étroitement liées à l'obésité et au syndrome métabolique, l'étiologie des NAFLD n'est pas la même chez tous les patients et demeure actuellement en grande partie non élucidée, ce qui complique la

prévention et la prise en charge de ces maladies. La seule recommandation actuelle visant à prévenir ou à limiter l'évolution de ces maladies consiste à soigner son hygiène de vie en pratiquant une activité physique régulière avec une alimentation équilibrée. Au-delà de leur rôle premier dans l'arrêt du saignement lors d'une blessure, les plaquettes sanguines sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques du fait des molécules qu'elles libèrent et de leur capacité adhésive accrue. Notamment, les plaquettes sanguines sont impliquées dans la régulation des mécanismes de régénération et de fibrose hépatiques. Les liens entre les NAFLD et les plaquettes sanguines qu'ils soient biologiques ou cliniques restent encore peu caractérisés. Comment les plaquettes sanguines, acteurs clés du maintien de l'intégrité vasculaire, peuvent réguler l'installation des NAFLD est une question très intéressante et novatrice et aborde un problème médical important sous un angle à la fois moléculaire et de physiopathologie intégrée. Ce projet de recherche devrait permettre d'identifier (i) de nouvelles pistes thérapeutiques en mettant en lumière de potentielles cibles pharmacologiques plaquettaires et/ou hépatiques, ou/et (ii) de nouveaux biomarqueurs plaquettaires et/ou hépatiques pour prévenir ou limiter les NAFLD.

Le nombre de souris estimé pour cette étude sur 5 ans est de 1048 animaux maximum avec un total de 10 procédures expérimentales. Ce grand nombre d'animaux est justifié par l'hétérogénéité du profil métabolique induit par les différents régimes hyperlipidiques chez l'animal, le nombre de procédures et le nombre de lignées murines utilisées. Seulement en fonction des résultats obtenus, un des régimes hyperlipidiques pourrait ne pas être utilisé ce qui réduira le nombre de souris total à 756. Ce nombre d'animaux sera aussi réduit au maximum (i) en suivant des protocoles expérimentaux établis et en tenant compte d'expériences déjà réalisées qui nous ont montré que nous pouvons obtenir des résultats statistiquement corrects en faisant des groupes de 6-12 souris selon la procédure réalisée, (ii) en limitant aux seules expériences considérées comme absolument indispensables en fonction des résultats obtenus dans les différentes lignées au cours de la réalisation des différentes procédures et (iii) par le fait que les expérimentateurs impliqués dans ce projet ont de nombreuses années d'expérience dans le domaine de l'expérimentation animale et les techniques utilisées sont parfaitement maîtrisées.

Le recours au modèle murin est irremplaçable pour la réalisation de ce projet de recherche pour deux raisons majeures: (i) la complexité et la multiplicité des mécanismes mis en jeu dans le contexte intégré physiopathologique du projet de recherche ne sont pas modélisables par des approches *in vitro* et (ii) l'utilisation des modèles murins génétiquement modifiés car il n'existe pas à ce jour d'inhibiteurs spécifiques des différentes cibles moléculaires testées. Les modèles de drosophiles ou de poissons zèbres ne sont utilisables dans le contexte de ce projet de recherche car les plaquettes sanguines sont phénotypiquement et mécaniquement très différentes de celles de l'Homme, ce qui n'est pas le cas chez les rongeurs.

De la naissance à la mort, les animaux sont hébergés avec un accès illimité à la nourriture et boisson avec du papier sopalin dans la cage et avec une observation quotidienne des souris par les zootechniciens. Mise à part les procédures expérimentales nécessitant un animal en vigilance (procédures 3,5,7,9) et les procédures de classe légère (procédures 1 et 2), les autres procédures expérimentales se font sous analgésie/anesthésie de l'animal pour limiter au maximum la douleur avec un contrôle permanent de l'état d'anesthésie. Dans le cas des procédures expérimentales de sévérité modérée nécessitant un animal en vigilance sans mise à mort à la fin de la procédure (procédures 3,5,7,9), les animaux seront surveillés avec une grande vigilance au long cours de la procédure et ensuite observés 2 fois par jour par les zootechniciens et les expérimentateurs pendant les 48h suivant la procédure. Une mise à mort rapide de la naissance à la mort, lors d'une procédure expérimentale ou à la suite d'une procédure sera effectuée si l'animal montre des signes de détresse et souffrance (prostration, comportement atypique, perte de poids conséquentes, grosses plaies/blessures) par dislocation cervicale avec anesthésie/analgésie au préalable. De la naissance à la mort, les souris sont hébergées et expérimentées selon les conditions de la directive européenne, régies par les principes de remplacement, de réduction et de raffinement (Règle des 3 R).

16886 La douleur viscérale (sensation de cisaillement, tension, brûlure, crampe...) est un symptôme courant à l'origine de millions de visites en consultation externe. Les enquêtes statistiques nationales sur

l'impact des maladies gastro-intestinales (GI) mentionnent systématiquement la douleur viscérale comme le symptôme le plus fréquent motivant une visite en consultation externe. Environ 5 % des patients suivis en médecine générale et 40 % des patients suivis en hépato-gastroentérologie présentent un trouble fonctionnel GI et la douleur constitue le symptôme le plus fréquent et le plus difficile à traiter. Ces patients nécessitent des ressources considérables en matière de soins de santé, le coût annuel des traitements s'élevant à 16,6 milliards de dollars aux États-Unis et à 28,4 milliards d'euros en Europe.

Les méthodes alternatives, permettant une évaluation nociceptive viscérale, sont inexistantes. Ainsi, ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement des douleurs viscérales. Les modèles d'hypersensibilité viscérale induits par des agents chimiques chez la souris sont des modèles largement décrits dans la littérature car, peu invasifs, demandant peu de manipulation des animaux et permettant une observation sur les animaux vigiles afin d'être au plus près de la pathologie humaine.

L'objectif de cette étude sera donc d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans des modèles d'hypersensibilité viscérale chez la souris (évaluation nociceptive). Afin de répondre à cet objectif, le nombre d'animaux utilisés sera de 960 souris en raison de 8 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. Conformément à la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux animaux. A savoir, des carrés de coton pur (type nestlets, permettant aux animaux de faire une nidation), des igloos, ou des aspen bricks.

Nous ne pouvons utiliser de médication analgésique puisque la douleur est le paramètre évalué. Cependant, un contrôle quotidien sera réalisé afin de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite aux éventuels effets secondaires des traitements :

- Altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de s'alimenter...),
- Vocalisation, tremblements...,
- Perte de poids élevée (mais < 20% du poids initial),
- Posture anormale (voûté ou déséquilibré pour soulager une zone douloureuse, démarche anormale, diminution des mouvements, prostration),
- Détection/présence d'une anomalie (plaie, pilo-érection...),

Dans le cas où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et à la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas au cours de la journée (les observations s'effectuant le matin) et qu'aucune solution ne pouvait être apportée, ce dernier serait mis à mort. De même, si un animal avait une perte de poids supérieure à 20%, l'expérimentateur mettrait à mort l'animal.

Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours, le suivi étant assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie le week-end. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

De plus, une des procédures de ce projet est classée comme une procédure sévère, ce qui implique qu'à la fin de ce projet une évaluation rétrospective, par le comité d'éthique, sera réalisée.

16887 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 et 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. 266 000 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.

16888 Les thérapies regroupent un ensemble de méthodes basées sur l'utilisation de l'hyperthermie (dépôt de chaleur) locale à des fins thérapeutiques incluant le traitement des cancers. La possibilité de délivrer localement une dose prédéterminée de chaleur aux tissus cancéreux permet d'envisager la délivrance locale d'un agent thérapeutique comme un médicament. L'objectif de ce projet est de montrer la libération locale d'un agent thérapeutique par une hyperthermie modérée dans un contexte tumoral. Dans le projet le médicament sera remplacé par un agent détectable par nos appareillages d'imagerie optique. Cet agent sera contenu dans des particules sensibles à l'élévation de la température, ainsi, lorsque nous appliquerons l'hyperthermie, les particules s'ouvriront pour libérer l'agent contenu. Nous utiliserons des cellules tumorales de cancer de la prostate génétiquement modifiées. Ces cellules seront injectées aux souris, sans présenter de phénotype dommageable, pour générer des tumeurs sous cutanées ou dans la prostate par chirurgie. Pour suivre la pousse des tumeurs mais également pour observer la libération de l'agent contenu dans les particules nous utiliserons des techniques d'imagerie optique qui sont des méthodes non invasives permettant ainsi de réaliser un suivi dans le temps sur un même animal.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est 144 souris : 96 modèles sous cutanés (16 lots de 6 souris) et 48 modèle de tumeurs dans la prostate 8 lots de 6 souris).

L'utilisation des animaux est indispensable pour reproduire les mécanismes complexes liés aux tumeurs et de ce fait ils ne peuvent être remplacés. Les particules thermosensibles seront d'abord testées sur des cellules en culture pour leur non toxicité mais également pour leur efficacité avant d'être injectées aux souris. La possibilité de générer 2 tumeurs sous cutanées sur un même animal et l'utilisation de l'imagerie optique nous permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés au total. Les animaux sont suivis quotidiennement par le personnel de l'animalerie en étroite collaboration avec l'expérimentateur. Les animaux sont hébergés dans le respect de leur bien être avec un enrichissement du milieu fourni par l'animalerie. Lors d'un acte chirurgical la gestion de la douleur est prise en compte par l'administration d'analgésiques. Au moindre signe de souffrance ou de mal être de l'animal, l'expérimentation est stoppée.

16889 Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Ils peuvent donc entraîner des effets secondaires aussi bien locaux que généraux. 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 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.

Il s'agit dans ce projet d'évaluer la pharmacocinétique (évaluation du devenir du produit dans l'organisme par dosage du produit et de ses métabolites) et/ou la pharmacodynamie de produits de santé (évaluation de l'effet du produit sur l'organisme par vérification des constantes biologiques). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de les évaluer sur des modèles animaux, les

rongeurs, lagomorphes et porcins sont des modèles privilégiés étant donné les similitudes physiologiques 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 réglementaires (Décret 2013-118) 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). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 800 rats, 500 porcins, 300 lapins et 250 chiens.

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). 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.

16890 La douleur est un problème de santé publique très important (10% de la population souffre d'une douleur chronique) autant dans la vie quotidienne que lors d'accidents ou suite à une opération chirurgicale.

Le système nerveux est le système physiologique qui permet de ressentir la douleur. Celui-ci utilise des chemins moléculaires afin d'envoyer le signal douloureux à l'organisme. Certains de ces chemins moléculaires ne sont pas encore connus.

Le projet consiste à utiliser un modèle de douleur afin de mettre en évidence le rôle de la molécule Fxyd2 dans les mécanismes douloureux et d'identifier de nouvelles molécules candidats médicaments pour traiter la douleur chronique.

Le modèle de douleurs neuropathiques Spared Nerve Injury (SNI) sur les souris et les rats, sera utilisé afin d'identifier de quelle manière intervient la molécule Fxyd2.

Des injections d'inhibiteurs de Fxyd2 seront effectuées sur ce modèle et l'impact de ces injections sur la douleur induite par le modèle SNI sera évalué à l'aide d'outils classiques pour mesurer la douleur mécanique.

Les animaux seront observés quotidiennement au cours de l'expérimentation et nous utiliserons la grille d'évaluation de la douleur pour évaluer l'état général et la douleur des animaux.

Il est prévu d'utiliser 72 souris et 84 rats, soit 156 animaux pour ce projet. Les groupes testés seront des animaux contrôles ou des animaux douloureux neuropathiques.

Ce projet porte sur la douleur. Par conséquent, l'utilisation des médicaments anti-douleur suite à l'établissement du modèle de douleur est proscrit. Cependant, 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. La douleur est une réponse de l'organisme entier face à une agression. Ce phénomène ne peut donc être étudié autrement qu'en utilisant l'organisme entier lui-même. Donc, il n'est actuellement pas possible de remplacer le modèle animal pour ce type d'analyse. Néanmoins, il est possible d'étudier *in vitro* certains mécanismes utilisés par la réponse douloureuse et c'est ainsi que nous avons pu identifier le gène Fxyd2. Nous sommes en train de développer un modèle *in vitro* de cellules souches humaines différenciées en neurones pour mieux comprendre le fonctionnement de la protéine FXD2 dans les neurones de la douleur. Cependant, pour étudier le rôle de cette molécule dans la réponse douloureuse globale, le recours à l'animal est obligatoire.

Afin de respecter la règle des 3R, le nombre de souris/rats utilisés sera réduit au minimum afin de limiter l'utilisation d'animaux vivants mais de manière à avoir des effectifs compatibles avec les tests statistiques utilisés. Comme cette étude porte sur le comportement douloureux, il paraît évident que

l'on ne peut supprimer toute douleur mais celle-ci est limitée le plus possible dans le temps. En particulier dans le cas des protocoles chirurgicaux (SNI), le temps d'expérimentation est réduit au strict nécessaire afin de limiter la souffrance des animaux dans le temps puisqu'on ne peut leur administrer de molécules antalgiques.

16891 Pour protéger un individu contre une maladie infectieuse, on peut essayer d'utiliser des cellules immunitaires produites par un individu (donneur) infecté et guéris pour les transférer chez un individu (receveur) qui vient d'être infecté afin de l'aider à détruire le microbe : exemple la grippe. Cette stratégie pourrait être adaptée et utilisée pour soigner des personnes infectées par le SARS-CoV2/ Covid-19.

Toutefois, il existe une barrière importante à franchir pour s'assurer du succès d'un tel transfert d'immunité : les individus donneur et receveur doivent être immunologiquement compatibles sous peine d'observer un rejet des cellules transférées. Pourtant, il existe une catégorie très spécifique de cellules immunitaires, des cellules hyper-activées, qui, au vu de leurs caractéristiques, les rendraient "invisibles" pour passer la barrière d'immuno-compatibilité.

Le but de ce projet est d'apporter la preuve scientifique que ces cellules hyper-activées, une fois purifiées, peuvent effectivement être transférées entre 2 individus non immuno-compatibles.

Pour atteindre cet objectif, nous montrerons chez les souris que le transfert de ces cellules hyper-activées spécifiquement sélectionnées ne provoquent pas de réaction de rejet. A l'inverse, le transfert de toutes les cellules immunitaires (avant sélection des cellules hyper-activées), utilisées comme contrôle positif induira un rejet. Dans cette procédure, nous utiliserons 88 souris receveuses.

Les souris sont produites en condition indemne d'infection. Ce qui permettra d'éviter des réactions liées à des antigènes de microbes préalablement existants.

REPLACER : A l'heure actuelle, il n'existe pas de système *ex vivo* ou *in vitro* permettant d'évaluer les rejets de greffons et la réponse immunitaire par l'organisme receveur. Les cellules greffées seront préparées en utilisant un modèle murin *ex vivo*, c'est-à-dire qu'aucun animal vivant n'est utilisé pour la préparation des cellules à greffer.

RAFINER : L'ensemble des expérimentations animales sera réalisé dans un établissement agréé, par du personnel compétent et selon l'autorisation de projet. Les volumes injectés sont réduits afin de ne pas induire de douleur. Les souris seront examinées quotidiennement par le personnel soigneur. Les prélèvements terminaux seront réalisés sous anesthésie générale profonde.

REDUIRE : Le nombre d'animaux par groupe assure des résultats statistiquement significatifs permettant une interprétation fiable des résultats.

16892 Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives fatales, incurables et qui ont la particularité d'être transmissibles, avec des périodes d'incubation longues pouvant excéder la moitié de l'espérance de vie de l'espèce considérée. Elles sont dues à des agents transmissibles non conventionnels (ATNC, ou prions). Chez les animaux, ces maladies, telles que la tremblante naturelle des petits ruminants et la maladie du dépérissement chronique des cervidés (chronic wasting disease, ou CWD), se transmettent entre individus majoritairement par voie oronasale. Chez l'être humain, l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB, ou maladie de la vache folle) est responsable de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (v-MCJ), vraisemblablement par consommation de produits alimentaires contaminés. Cette souche d'ESB est à ce jour la seule souche de prion animale pour laquelle le risque zoonotique (transmission de l'animal à l'humain) est avéré.

La maladie du dépérissement chronique affecte plusieurs espèces de cervidés sauvages (cerf-mulet, cerf à queue blanche, wapiti, élan/caribou) depuis près de 40 ans en Amérique du Nord (Etats-Unis, Canada), où la distribution géographique de cette maladie s'étend année après année. Tandis que l'Europe semblait épargnée jusque-là, les premiers cas de CWD ont été décrits en Europe du Nord en 2016, avec à ce jour plus de 40 cas en Norvège, 2 cas en Suède et un cas en Finlande. Les premières études de typage indiquent que ces souches de prion nouvellement identifiées pourraient différer des souches américaines.

Depuis de nombreuses années, des études *in vitro* et *in vivo* sont mises en place pour évaluer le risque que représente les maladies à prion animales pour l'être humain (risque zoonotique). Les études *in*

vivo sont principalement basées sur les deux modèles les plus pertinents pour modéliser la situation humaine, à savoir les souris transgéniques humanisées (exprimant la PrP - protéine prion - humaine) ou les primates non humains (PNH). Ces deux modèles sont complémentaires :

- les modèles de souris humanisées miment au mieux la barrière d'espèce moléculaire au niveau de la protéine prion (susceptibilité théorique de transmission)
- les modèles PNH permettent d'évaluer la plausibilité d'une contamination naturelle notamment par voie orale.

En ce qui concerne le risque que représente le CWD pour l'être humain, les études de transmission réalisées jusqu'à ce jour sont uniquement basées sur les souches issues d'Amérique du Nord. Elles ne permettent pas pour l'instant de conclure de façon définitive quant au risque zoonotique lié à ces souches de prion. Dans les modèles murins, plusieurs études de transmission sont négatives, mais pour certaines les animaux présentent des infections subcliniques, ce qui suggère en général des périodes d'incubation très longues, excédant l'espérance de vie de l'espèce considérée. Parmi les modèles PNH, certains développent après exposition au CWD des maladies à prion cliniques avec les caractéristiques classiques (signes neurologiques, spongiose du système nerveux et accumulation de PrP anormale), tandis que d'autres développent des formes atypiques de maladie.

L'étude présentée ici envisage d'évaluer le risque zoonotique de différents isolats de CWD d'Europe du Nord, qui diffèrent des isolats américains étudiés précédemment. En effet, des études *in vitro* récentes suggèrent que le risque zoonotique du CWD pourrait être très variable, selon notamment, l'espèce considérée de cervidé, le génotype des animaux (pour la protéine prion) ainsi que le génotype humain (deux types de PrP, avec soit une méthionine soit une valine pour le 129ème acide aminé de la PrP).

Ce risque zoonotique sera tout d'abord évalué dans des modèles de souris humanisées (souris transgéniques exprimant la PrP humaine sous l'une ou l'autre de ses formes). En parallèle, des souris exprimant la PrP de macaque seront également exposées : elles permettront d'identifier les isolats capables d'interagir avec la PrP de macaque, et par conséquent mieux cibler (réduction) les isolats utilisés dans des études futures sur primates non humains (macaques) pour modéliser le risque zoonotique dans des conditions d'exposition naturelle (voie orale principalement).

Compte tenu de la diversité possible des souches sur le terrain (les isolats disponibles à ce jour proviennent de trois pays différents, et affectent au moins trois espèces animales différentes : renne, cerf rouge et élan), nous prévoyons de tester jusqu'à 10 isolats ; chacun de ces isolats sera testé en parallèle dans trois modèles de souris transgéniques (deux modèles exprimant la PrP humaine, un modèle exprimant la PrP de macaque), ce qui implique compte tenu de la faible prévalence de transmission attendue que chaque isolat soit testé sur un maximum de 100 souris transgéniques. Au total, cette étude portera donc sur un maximum de 1000 souris nées et élevées en captivité dans des établissements agréés.

Les rongeurs, hébergés en groupe dans un milieu enrichi, seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. A l'installation de signes neurologiques évidents spécifiques des maladies à prions ou de signes de souffrance incompatibles avec une survie dans des conditions décentes (perte d'autonomie, douleur ne rétrocedant pas aux traitements analgésiques, ...) qu'ils soient liés ou non à l'inoculation, les animaux seront euthanasiés et les lésions spécifiques des maladies à prions seront recherchées dans leur cerveau par des techniques biochimiques et histologiques pour confirmation du diagnostic clinique établi.

16893 Les pathologies respiratoires des jeunes enfants sont un problème majeur de santé publique car elles constituent la première cause de mortalité dans cette population en France. Le virus respiratoire syncytial (VRS) 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.

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est une bactérie responsable d'infections pulmonaires graves chez les patients atteints de mucoviscidose. L'implantation de *P. aeruginosa* est souvent

favorisée par le VRS. Au vu de l'émergence rapide de résistances aux antibiotiques et du manque d'antiviraux, il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques comme les probiotiques.

Les probiotiques sont des microorganismes qui confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte. Chez l'être humain, des probiotiques (dont des *Lactobacillus*) ont été administrés par voie orale ou gastrique pour prévenir des pneumonies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique. L'administration nasale de *Lactobacillus* est intéressante puisqu'elle permet une stimulation directe du système immunitaire respiratoire local. Lors d'une étude princeps, un criblage bactérien à partir de 137 souches de *Lactobacilles*, toutes issues de patients atteints de mucoviscidose, a permis d'identifier 2 souches pour leur forte activité anti-*P. aeruginosa*. Ces deux bactéries (*L. salivarius* et *L. brevis*), administrées préventivement dans un modèle murin C57BL/6 d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, possèdent un effet anti-*P. aeruginosa* significatif très intéressant. Cette étude préliminaire réalisée sur des souris C57BL/6, a permis de mettre en évidence que la viabilité des *Lactobacilles* était indispensable à leur activité anti-*P. aeruginosa* et que le mode d'instillation nasal permettait de lutter plus efficacement contre *P. aeruginosa* au niveau pulmonaire par rapport à une administration orale. Au vu de ces premiers résultats identifiant des *Lactobacillus* au potentiel anti-*P. aeruginosa* dans des souris C57BL/6, les investigations nécessitent d'être étendues dans un autre modèle : les souris BALB/c qui constituent le modèle de référence concernant les infections pulmonaires au VRS.

Sachant que les infections au VRS favorisent la survenue d'infections à *P. aeruginosa* et devant le manque d'antiviraux contre le VRS, il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques comme les probiotiques. 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 (i) un modèle mono-infectieux d'infection pulmonaire au VRS d'une part, et dans un second temps (ii) sur un modèle de sur-infection à *P. aeruginosa* (modèle mimant la cinétique infectieuse observée chez les patients atteints de la mucoviscidose). Les expérimentations menées avec le VRS seront effectuées par notre équipe qui a l'expérience de ce pathogène et du modèle murin associé. Nous proposons dans une première partie du projet de traiter préventivement par voie intranasale les souris BALB/c avec *L. salivarius* ou *L. brevis* quelques heures avant l'infection des animaux par le VRS-luciférase humain (virus pouvant être détecté par bioluminescence). Une expérimentation intégrera 6 lots de souris. Dans le but d'obtenir des résultats robustes d'un point de vue statistique, un minimum de 7 souris sera utilisé par lot. Afin d'appliquer le principe de réduction, nous utiliserons le virus VRS-luciférase pour analyser au cours du temps dans un même individu la réplication virale par bioluminescence à 48 et 72h post-infection. Par conséquent, pour une expérimentation nous aurons au total 42 souris. L'effet du traitement par les *Lactobacillus* sera donc évalué au cours du temps sur les animaux vivants en quantifiant l'activité de la luciférase par bioluminescence à l'aide d'une caméra d'imagerie fonctionnelle IVIS. A 72h post-infection virale, les animaux seront euthanasiés pour analyser la réponse immunitaire dans les poumons et le sang. Nous définirons ainsi si ces souches *L. salivarius* ou *L. brevis* possèdent une activité anti-VRS. Dans une seconde partie de projet, nous proposons de traiter préventivement par voie intranasale les souris BALB/c avec *L. salivarius* ou *L. brevis* quelques heures avant l'infection par le VRS-luciférase humain. Afin de mimer une sur-infection bactérienne, les souris seront infectées 24h après l'infection par le VRS par *P. aeruginosa* par voie intranasale. L'effet du traitement par les *Lactobacillus* sera évalué sur la réplication virale par bioluminescence à l'aide de l'appareil IVIS sur les animaux vivants 48 et 72h post-infection. A 72h post-infection virale, les animaux seront euthanasiés pour analyser la réponse immunitaire dans les poumons et le sang. Nous analyserons également la quantité de *P. aeruginosa* dans les poumons. Grâce à ce nouveau modèle d'infection par le VRS suivi d'une sur-infection bactérienne par *P. aeruginosa* nous pourrions évaluer si les souches *L. salivarius* ou *L. brevis* conservent une activité anti-VRS et anti-*P. aeruginosa*.

Le recours aux animaux est indispensable pour répondre aux questions scientifiques du projet qui se déroulera sur une période de 5 ans et nécessitera au maximum 252 souris BALB/c adultes. Ce nombre est justifié par le fait que la pertinence d'une expérience repose sur la réalisation de tests statistiques basés sur un effectif suffisant pour attester d'une différence biologique ainsi que l'inclusion de groupes expérimentaux témoins. Le VRS humain peut se répliquer dans les poumons des souris mais ne les rend pas cliniquement malades. Cependant, il est possible de mettre en évidence la réponse inflammatoire et immunitaire dans le poumon. La souris est un excellent modèle pour notre étude, de

par sa sensibilité au VRS humain ainsi que la très forte similarité de la réponse immunitaire entre l'homme et la souris observée après infection. 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, le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet. Les animaux seront hébergés en cages collectives et auront à disposition des mouchoirs en papier pour leur permettre de faire leur nid. Afin de réduire au maximum la douleur et le stress des animaux nous les anesthésierons avant toute manipulation et ils seront placés sous lampe chauffante pour une meilleure récupération. Les animaux seront observés quotidiennement ce qui nous permettra d'intervenir rapidement si des signes de souffrance étaient constatés.

16894 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.

En physiologie, la locomotion est la faculté, pour un organisme vivant, de se mouvoir pour se déplacer. Dans des contextes d'ulcération de pieds diabétiques, cette locomotion est un acteur clé. En effet, elle joue un rôle indispensable dans l'hygiène de vie des patients et pourrait contribuer à l'amélioration de la cicatrisation des ulcères. Il est très bien décrit que la marche fractionnée a pour objectif de favoriser le retour veineux du sang vers le cœur. Elle permet aussi d'entretenir la musculature de la jambe, notamment du mollet, qui participe à ce retour veineux. Bien plus encore, la marche est capable d'augmenter la perfusion tissulaire locale du pied, et donc, d'améliorer la cicatrisation des ulcères. Même si les ulcères sont douloureux et infectieux, l'immobilité est à éviter car celle-ci favorise la stase veineuse qui est un facteur aggravant d'ulcère. Il est donc urgent de développer, en clinique, de nouvelles thérapeutiques ainsi qu'un suivi plus adapté de l'activité physique des patients diabétiques.

L'objectif de ce projet est d'observer l'impact de la locomotion (de la course) sur la cicatrisation d'ulcères sur des modèles murins diabétiques. Nous émettons l'hypothèse que des souris diabétiques, ulcérées et exposées à de l'hypoxie intermittente présentent une amélioration de la cicatrisation si elles sont confrontées à de l'exercice.

Durant cette étude nous utiliserons 64 souris (40 db/db et 24 C57BL/6J) afin de visualiser la cicatrisation sur 2 modèles de souris. 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 de la course sur un tapis roulant tout au long de la cicatrisation de l'ulcère (24 db/db et 24 C57BL/6J). Si les résultats concernant l'impact de l'exercice sur la cicatrisation des ulcères sont positifs, nous testerons cet exercice sur 16 souris db/db exposées à de l'hypoxie intermittente chronique et ulcérées. Nous espérons, pour ce projet, démontrer l'intérêt de l'exercice chez des patients diabétiques présentant un ulcère du pied.

16895 La réalisation d'études de toxicologie est une obligation réglementaire lors du développement d'un médicament humain ou vétérinaire ou pour toute substance chimique. Ces études servent à évaluer la sécurité d'un médicament avant les premiers essais cliniques chez l'homme ou l'animal ou à évaluer la sécurité de substances chimiques avant mise sur leur mise sur le marché. L'objectif de ce projet est la réalisation des études réglementaires de toxicologie générale, génotoxicité, tolérance locale,

toxicologie de la reproduction et du développement et toxicologie juvénile et des études préliminaires (Recherche de dose, pharmacocinétique) chez le rongeur génétiquement altéré. Ces études consistent en une administration unique ou répétée du produit à tester suivi d'observations régulières des animaux, suivi du comportement, de la consommation alimentaire et du poids, évaluation des effets sur les paramètres sanguins ou urinaires et analyse macroscopique ou histopathologique. Le choix du rongeur est basé sur la réglementation en vigueur (ICH, FDA, EMA, ...) qui demande la réalisation d'études précliniques sur deux espèces, une espèce rongeur et une espèce non rongeur. Le nombre d'animaux utilisé est défini par la réglementation et les guidelines et est adapté à la nécessité d'obtenir des résultats fiables sur un effectif suffisant tout en limitant le nombre d'animaux au strict nécessaire. Ce nombre est estimé à 19056 par an soit 95280 animaux. Ce nombre important s'explique par la variété importante d'études dans ce projet et la durée du projet (5 ans). Il n'est pas possible de substituer l'animal par des méthodes alternatives car le modèle doit pouvoir mimer au mieux les interactions complexes biologiques et physiologiques retrouvées chez l'être humain et doit aussi permettre l'observation de signes cliniques. Pour améliorer leur bien-être, les animaux sont hébergés en groupes sociaux dès que cela est compatible avec la procédure expérimentale et le comportement des animaux. Les rats et souris sont hébergés sur litière de copeaux de bois et reçoivent un enrichissement adapté tel que papier kraft, bâtonnets de bois à ronger et tunnels... Les techniques engendrant le moins d'inconfort ou sur une durée la plus courte possible pour l'animal seront privilégiées. Les autres techniques ou procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie avec le cas échéant un protocole d'analgésie adapté. Les animaux sont suivis quotidiennement sous la supervision d'un vétérinaire. Des points limites précoces sont appliqués de telle sorte qu'en cas de signes cliniques ayant des répercussions significatives sur l'animal, des mesures sont rapidement prises pour limiter la souffrance (mise en place d'un traitement analgésique, diminution de la dose testée, suspension de la procédure ou euthanasie).

16896 L'obésité et le vieillissement sont associés avec un risque élevé de développer des pathologies chroniques et multi-systémiques telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. Un phénomène commun à l'obésité et au vieillissement est l'accumulation de dommages cellulaires et tissulaires qui impactent de nombreux organes et favorisent la progression de désordres cardio-métaboliques et la dépendance des individus. A ce jour, la compréhension des mécanismes, de la hiérarchisation et de la chronologie des défaillances reste incomplète. De plus les interventions permettant de ralentir la progression de ces désordres et de restaurer les fonctions altérées restent limitées. Récemment, des approches nutritionnelles basées sur la chronobiologie et proposant un accès restreint à l'alimentation en fonction du temps tout en maintenant l'apport calorique journalier ("Time Restricted Feeding" (TRF)) s'est avéré une option prometteuse pour maintenir et restaurer les fonctions cardio-métaboliques. Cependant, à ce jour, les effets à long-terme du TRF ainsi que son impact différentiel en fonction de l'âge et du sexe restent à évaluer. Il apparaît essentiel d'évaluer et de mesurer les effets indésirables et bénéfiques d'un TRF à long terme sur un modèle pré-clinique tel que le rongeur, qui répond parfaitement au contrôle de l'apport calorique de type TRF.

Ainsi, l'objectif de notre projet est de déterminer si, à long terme, un TRF pourrait prévenir ou ralentir l'apparition des désordres multi-organes liés au vieillissement et d'en comprendre les mécanismes. Ce projet sera réalisé dans le contexte d'un vieillissement naturel et accéléré par l'obésité en considérant 1) l'âge d'intervention et 2) le sexe.

L'étude nécessitera l'utilisation d'une souche de souris classiquement utilisée dans les études du métabolisme et de l'obésité. Les souris seront hébergées par cage comportant un nombre d'individus adapté en fonction de leur poids. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés une fois par semaine pour détecter de potentielles anomalies comportementales (e.g. prise alimentaire, posture, toilette). Des carrés de ouate seront placés dans les cages systématiquement pour permettre aux animaux de faire des nids, ainsi que des igloos lors de la première mise en contact avec leurs congénères.

Pour éviter l'agressivité entre les mâles, nous maintiendrons des fratries au sein de la même cage et/ou des animaux de carrure et âge comparables. Néanmoins, si des blessures surviennent, les animaux seront soit séparés et leurs blessures traitées, soit euthanasiés (en fonction des blessures, sur avis du

responsable de la structure). Les manipulations prévues sont non-invasives et ne devraient en aucun cas entraîner de douleur ou mettre en danger la vie de l'animal. Les études sur ces souris seront terminées par des prélèvements de tissus et organes après une méthode d'euthanasie appropriée et réglementaire.

Afin de limiter le nombre d'animaux pour cette étude, nous avons réalisé une veille bibliographique et conçu les expériences afin d'obtenir un pouvoir statistique suffisant avec un nombre minimum d'individus. Lorsque certains animaux seront utilisés pour plusieurs procédures indolores il sera vérifié que celles-ci sont compatibles et appliquées séquentiellement après un repos entre chaque procédure. La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 624 animaux distribués de manière homogène en fonction de l'âge et du sexe dans les lots suivants :

Mise en régime normal: 336

Mise en régime obésogène: 288

Mise en TRF : 288 parmi le lot en régime normal (168) et obésogène (168)

Traitement Sénolytique: 192 parmi le lot en régime normal (96) et obésogène (96)

16897 La capacité à prendre une décision adaptée dans un environnement en perpétuel changement est capitale pour la survie des organismes. Cette capacité repose sur de multiples processus élémentaires qui sont largement conservés chez les mammifères. Pour cette raison, l'utilisation de rongeurs permet effectivement d'analyser chez l'animal des fonctions cognitives de haut niveau, fortement intégratives, qui, par définition, ne peuvent s'étudier qu'à l'échelle de l'organisme entier. L'utilisation de rongeurs permet de procéder à des études fonctionnelles permettant ainsi de clarifier les bases neurobiologiques de la prise de décision. Cette recherche est un enjeu important non seulement en termes de recherche fondamentale, à la croisée entre des disciplines aussi variées que la neurobiologie, la psychologie expérimentale ou encore plus récemment la neuroéconomie, mais également en termes de recherche biomédicale puisque la prise de décision est inadaptée dans nombre de pathologies mentales comme la schizophrénie ou l'addiction.

Le présent projet d'une durée de 4 ans et nécessitant l'emploi d'un total de 766 animaux vise à clarifier les bases fonctionnelles de l'architecture corticale permettant une décision adaptée. Pour ce faire, nous procéderons à i) des études de neuroanatomie visant à la description de l'architecture des régions frontales et leurs neuromodulation ii) des manipulations fines, réversibles et peu invasives de certains neurones du réseau sélectionnés selon leurs projections spécifiques dans des épreuves comportementales modélisant certains aspects spécifiques de la prise de la décision iii) des enregistrements de l'activité neuronale au sein des réseaux et sous réseaux neuronaux.

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 dans le cas où les mesures de prises en charge de la douleur et de l'inconfort résultant éventuellement de l'étape chirurgicale ne seraient pas suffisantes.

16898 *Enterococcus faecium* est une bactérie appartenant au genre *Enterococcus* (entérocoques). Comme tous les entérocoques, elle est susceptible d'entraîner des infections, et notamment en milieu hospitalier (infections nosocomiales). Par exemple, aux USA, les entérocoques (surtout *E. faecium* et *faecalis*) sont les seconds pathogènes retrouvés dans les bactériémies (infections du sang) et dans les infections du tractus uro-génital. Les bactériémies à *E. faecium* conduisent en général à des endocardites infectieuses pouvant amener au décès des patients. Au fil des années, les entérocoques ont développé des résistances aux antibiotiques de référence tels que la vancomycine et sont devenus une vraie menace en termes de santé publique. En effet, le nombre d'infections à VRE (Vancomycin

Resistant Enterococcus) dans les hôpitaux américains a progressé de 9820 cas en 2000 à 21352 en 2006. Les VRE sont très souvent associés à d'autres résistances, comme par exemple la résistance à la gentamicine, ce qui restreint le choix de l'antibiothérapie. L'une des pistes thérapeutiques envisagée consiste à développer des composés capables de restaurer / potentialiser l'activité de la gentamicine en réduisant sa CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). C'est dans ce contexte que le composé BFP04F10 est actuellement à l'étude. Il a montré, *in vitro*, un effet potentiateur de la gentamicine sur les souches d'Enterococcus faecium (diminution considérable des CMI) et pourrait être utile dans le traitement des bactériémies/endocardites à VRE. Toutefois, son activité *in vivo* nécessite d'être investiguée. Ce projet fait suite au projet APAFIS#26047-2020061514457843 v3.

L'objectif de cette étude consistera à déterminer l'efficacité du composé BFP04F10 seul ou associé à la gentamicine dans un modèle d'infection systémique (sepsis) à E. faecium chez la souris.

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 4 par groupe (au lieu de 10 en fonction du modèle) grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Des analyses *in vitro* ont déjà été réalisées sur l'efficacité du composé BFP04F10. 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).

46 souris CD1 seront nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

16899 L'imagerie médicale par Résonance Magnétique (IRM) sert au diagnostic de nombreuses pathologies cérébrales (accident cérébral vasculaire, tumeurs...). Elle est basée sur le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : sous l'effet d'un champ magnétique intense, certains noyaux se magnétisent. Cette aimantation macroscopique est exploitée pour déterminer les structures moléculaires. Conventionnellement, la RMN se focalise sur la détection des noyaux d'hydrogène (^1H) de l'eau (H_2O) en raison de son abondance dans les tissus mous ce qui permet une excellente visualisation de ceux-ci.

Cependant, il est possible de détecter et quantifier de nombreux métabolites (et électrolytes) d'intérêt pour la biochimie, la physiologie et la pharmacologie, que ce soit en conditions normales ou pathologiques. L'avènement des très hauts champs magnétique ouvre la voie de la spectroscopie et de l'imagerie de noyaux moins abondants tels que le carbone-13 (^{13}C), le lithium-7 (^7Li), l'oxygène-17 (^{17}O), le phosphore-31 (^{31}P), le sodium-23 (^{23}Na) ou encore le tritium (^3H). Alternativement, il est également possible de détecter indirectement certains de ces métabolites via les atomes d'hydrogène auxquels ils sont associés. Ces nouvelles approches d'imagerie offrent des perspectives extrêmement intéressantes. Elles doivent permettre d'apporter une multitude d'informations physiologiques et biochimiques qui pourraient à terme aider dans la compréhension des processus physiopathologiques des maladies cérébrales, mais aussi pour les maladies métaboliques affectant les muscles et certains cancers. Ultiment, ces méthodes pourraient servir à l'évaluation de nouvelles thérapies.

Notre objectif est le développement et la validation d'outils dédiés à la RMN à haut champ magnétique : 7 teslas ou plus alors que l'intensité de la majorité des appareils IRM installés dans les hôpitaux est de 1,5 teslas. En effet, les hauts champs magnétiques permettent de disposer d'une plus grande quantité de signal et d'améliorer les résolutions spatiales et temporelles des examens IRM. Notamment, nous travaillons à la mise au point d'antennes radiofréquences (des éléments centraux des scanners IRM) et de schémas d'acquisition optimisés pour les différents noyaux non-proton observables *in vivo*. Ces mises au point, optimisation et validation précliniques constituent une étape cruciale, nécessaire à la préparation des demandes d'autorisation pour l'application de ces méthodes et l'homologation éventuelles de nos appareillages dans un contexte de recherche clinique chez le volontaire sain puis le patient. Par ailleurs, la mise en place de nouveaux outils pour l'imagerie cérébrale permettra d'accroître nos connaissances sur le cerveau sain en recherche fondamentale et de réaliser en

recherche biomédicale un suivi plus précis de l'état du cerveau des patients et des modèles animaux utilisés pour caractériser les mécanismes associés à ces affections cérébrales.

Afin de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire, les tests préliminaires seront systématiquement menés sur des objet-tests. Cependant, à l'heure actuelle, la complexité anatomique, fonctionnelle et métabolique du cerveau ne peut être appréciée à l'aide d'objets-test aussi évolués soient-ils. Aussi le passage par l'expérimentation animale (rongeur ou primate non humain) demeure une nécessité. Les effectifs de souris, rats et macaques pour toute la durée du projet ont été estimées respectivement à 90, 90 (18 par an en moyenne) et 6. Ces effectifs seront soumis au plus à 3 procédures correspondants aux diverses étapes de développement et d'acquisition de données de référence pour l'exploration du métabolisme cérébral chez l'individu adulte anesthésié. De plus, les animaux seront amenés à être réexaminés avec un délai minimal de 15 jours entre chaque examen RMN. Pour certaines approches dynamiques d'étude du métabolisme ou de la fonction cérébrale, des substrats énergétiques seront infusés et des stimuli somato-sensoriels seront présentés aux animaux. Tous les animaux seront issus d'établissements éleveurs ou de fournisseurs agréés et seront hébergés en groupe conformément aux règles en vigueur de l'animalerie et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter et limiter toute souffrance : anesthésie lors des examens RMN, suivi en continu des paramètres physiologiques pour intervenir immédiatement et mise en place de protocoles analgésiques en cas de douleur ou souffrance de l'animal. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte des effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation mettra en œuvre des traitements appropriés ou décidera d'une euthanasie.

16900 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 dépistage et de prise en charge, il n'occupe que la cinquième place en terme 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 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. Cependant, ces derniers sont quand même présents et il est important de pouvoir optimiser le traitement pour améliorer la qualité de vie du patient.

Si aujourd'hui les outils diagnostiques s'orientent vers une détection précoce des tumeurs de petite taille, le contrôle et la précision des traitements HIFU sont actuellement insuffisants pour permettre une destruction efficace et localisée de ces foyers cancéreux en particulier au plus proche de zones sensibles comme l'urètre par exemple.

Un suivi de la lésion en temps réel permettrait d'éviter à la fois le sous-traitement qui peut conduire une rechute du patient et le sur-traitement qui peut entraîner des dommages sur des structures adjacentes et des effets secondaires. Les techniques ultrasonores sont particulièrement adaptées car l'échographie est déjà intégrée pour le guidage du traitement. L'élastographie (la mesure de l'élasticité par ultrasons) permet de détecter le durcissement des tissus suite à l'élévation en température due aux HIFU.

De plus, la zone traitée inclut une marge importante autour de la cible car les outils d'aujourd'hui ne sont pas suffisamment performants pour pouvoir à la fois repérer la tumeur et la traiter de façon précise. Aujourd'hui, une nouvelle technologie, CMUT (Capacitive Micro Ultrasound Technology), applicable aux HIFU a fait son apparition. Contrairement à la technologie actuelle, CMUT permet de multiplier les éléments (64 à la place de 16) qui conduisent à la focalisation des ultrasons et donc d'augmenter la précision du traitement. Elle permet également d'avoir une sonde plate (contrairement à une sonde incurvée actuelle), ce qui est propice à l'intégration d'une sonde d'imagerie échographique de meilleure qualité.

OBJECTIF : Ce projet est inclus dans un vaste programme de recherche qui vise à améliorer de façon globale le traitement du cancer de la prostate par les HIFU notamment en améliorant la sonde, la séquence de traitement et le contrôle de la lésion. L'objectif de ce projet est de tester et valider *in vivo*

cette nouvelle technique de suivi de lésion ainsi que cette nouvelle sonde de traitement sur un modèle porcine en comparant les lésions réalisées avec cette nouvelle sonde et l'ancienne. En dernière partie du projet, si les résultats montrent l'efficacité de la technique et de la sonde, elles pourront être testées avec une nouvelle séquence de traitement appelée c-shot qui aura été testée indépendamment et aura montrer l'amélioration du traitement (capacité à traiter des zones de formes complexes).

La prostate du porc étant petite et difficilement accessible et la voie de traitement chez l'humain étant la voie rectale, le foie est choisi (propriétés acoustiques similaires à celles de la prostate) comme cible et les lésions seront effectuées à travers le cæcum pour modéliser la paroi rectale (qui doit être épargnée lors du traitement). Des lésions dont la position et la géométrie seront précisément déterminées seront réalisées sur le foie de l'animal. En terme de positionnement, la conformité des lésions obtenues sera évaluée à l'aide de repères (ressorts...) préalablement injectés dans le foie. En terme de géométrie, la conformité sera évaluée par élastographie, méthode qui sera validée lors de la procédure 1 mais également a posteriori par IRM sur le foie prélevé et par histologie.

TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle sera composé de 5 procédures sans réveil et mettra en œuvre 50 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 maximum. Au terme de la procédure, l'animal sera euthanasié et le foie prélevé.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

Remplacement : La perfusion sanguine peut avoir un effet important 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 la séquence de traitement ce qui a permis de repousser l'expérimentation animale jusqu'au stade où elle devient inévitable. La sonde a été d'abord testée *in vitro*.

Réduction : Des essais préliminaires ont été réalisés *ex vivo*, ce qui nous a permis de déterminer qu'il est possible de réaliser 4 lésions par animal, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés.

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.

16901 Dans le cadre de la production et du développement de médicaments à usage humain ou vétérinaire, l'obtention d'anticorps spécifiques est indispensable pour répondre aux enjeux de la santé humaine. En effet, les spécialités issues de cette production contribuent à la fabrication et au développement de médicaments nécessaires à la protection contre des maladies infectieuses.

Afin de produire ces anticorps, les chevaux sont immunisés de manière répétée afin d'obtenir une quantité élevée d'anticorps dans leur sang. L'immunisation est réalisée par des injections d'antigènes, comme par exemple des vaccins.

A l'issue de la phase d'immunisation, des prélèvements sanguins sont réalisés sur les chevaux.

Les animaux peuvent présenter des inflammations locales liées aux injections répétées et à la nature des antigènes injectés. Dans de rares cas, des effets secondaires plus importants peuvent être observés. Des mesures vétérinaires sont alors immédiatement mises en place. (Traitements, arrêt temporaire ou définitif du protocole).

50 chevaux sont concernés pour la durée du projet (5 ans). A la fin du projet les chevaux sont réformés, pour leur grande majorité, et replacés en tant que chevaux de loisir.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

L'état de la science ne permet pas de fabriquer d'anticorps polyclonaux autrement qu'en ayant recours à l'animal.

Dans le cas de certaines maladies, des anticorps monoclonaux peuvent être synthétisés (production industrielle sans animaux) mais les résultats de protection obtenus à ce jour avec de tels anticorps ne sont pas encore satisfaisants.

Réduction : Le nombre d'animaux est proportionnel à la demande de produits thérapeutiques mis à la disposition des patients humains ou animaux.

Le nombre d'animaux utilisé est limité au maximum. Pour ce faire, les globules rouges leur sont restitués en partie, ce qui permet de répéter les prélèvements et d'obtenir des quantités importantes d'anticorps avec le moins d'animaux possible, sans nuire à l'état général des donneurs.

Raffinement : Les chevaux sont hébergés en groupes stables de 5 à 20 individus dans des parcs disposant d'un abri paillé, d'un paddock stabilisé et d'une pâture. Ils sont observés quotidiennement. Les prélèvements sont réalisés sur des animaux en parfaite santé.

Des examens sanguins sont très régulièrement effectués afin de détecter précocement toute éventuelle anémie. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Il peut décider à tout moment de la réforme d'un cheval s'il la juge nécessaire. Dans ce cas, le cheval reçoit les soins prescrits, avant d'intégrer le circuit d'adoption mis en place par la société.

16902 Les anticorps monoclonaux sont des protéines capables de reconnaître spécifiquement un antigène. Cette particularité en fait un outil majeur pour la mise au point de tests rapides de diagnostic et de détection de pathologies infectieuses. Aujourd'hui la crise sanitaire de la COVID-19 montre l'importance de disposer de différents formats de tests afin de désengorger les centres de diagnostic et de permettre à tous d'accéder rapidement à un test COVID-19. Pour cela, il existe les tests PCR, des tests salivaires et des tests rapides antigéniques. Ces derniers ont été autorisés par le gouvernement le 16 septembre 2020. Depuis, la demande pour ces tests est très importante et doit être satisfaite sans délai. Les industriels français vont produire dans les semaines à venir des quantités très importantes de tests rapides antigéniques (plusieurs millions), et ont donc besoin de quantités importantes d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps sécrétés par des cellules, appelées hybridomes, peuvent être produits *in vitro*, mais les quantités requises induisent des délais de 13 à 20 semaines. Ces délais peuvent être réduits à environ 5 semaines en produisant le premier lot de ces anticorps *in vivo* chez la souris. Selon la productivité des cellules productrices de ces anticorps, il sera nécessaire d'utiliser 550 souris au maximum pour produire les quantités nécessaires de deux anticorps qui permettront la fabrication de 4 millions de tests antigéniques rapides COVID-19. Tout sera mis en œuvre pour réduire ce nombre de souris qui sera ajusté au strict minimum en fonction de la productivité observée dans une étude préliminaire à petite échelle (10 souris). Soit 560 souris au total.

Tous les animaux seront issus d'élevages autorisés et dédiés à l'expérimentation. Pendant toute la procédure, une attention particulière sera portée aux animaux, par un recours à une analgésie systématique et suffisante pour éviter toute souffrance. Les animaux seront hébergés dans une installation saine et réservée à cet effet, en groupe sociaux avec un enrichissement de milieu, de manière à respecter leur mode de vie. Ils seront observés quotidiennement par une équipe soucieuse de leur état de santé. Des critères d'arrêt ont été définis et validés par un vétérinaire et seront mis en application lors d'éventuels effets inattendus.

16903 Les lymphocytes B sont des cellules clés dans le système immunitaire adaptatif, notamment par la production d'anticorps dirigés contre les antigènes. La molécule Bob1 a été décrite pour jouer un rôle important dans la biologie des lymphocytes B. Nous avons précédemment montré une surexpression du gène codant Bob1, POU2AF1, dans le sang de patients qui vont développer une dysfonction chronique du greffon pulmonaire après transplantation pulmonaire. Récemment, une collaboratrice, qui va rejoindre notre équipe en Septembre 2020, a montré *in vitro* que la surexpression de Bob1 favorise la différenciation de lymphocytes B en lymphocytes B mémoires et plasmocytes sécrétant des anticorps. Ces résultats suggèrent que l'altération d'expression de Bob1 contribue à une dérégulation du système immunitaire, comme observé en transplantation pulmonaire ou lors de maladies autoimmunes comme l'arthrite rhumatoïde. Dans le cadre d'un projet ANR (Agence nationale de la recherche), nous

souhaitons d'une part valider ces résultats et d'autre part analyser le rôle physiopathologique de Bob1 *in vivo*.

L'étude de la surexpression de Bob1 *in vivo* permettrait de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et de comprendre plus en détail son rôle lors de la différenciation des lymphocytes B et lors de leur interaction avec les autres cellules du système immunitaire dont les lymphocytes T. Pour cela, nous souhaitons générer un modèle de souris surexprimant Bob1 spécifiquement dans les lymphocytes B grâce à des souris transgéniques produites par nos collaborateurs. Ces souris seront alors utilisées pour étudier le rôle de Bob1 dans la réponse primaire puis secondaire aux antigènes (production d'anticorps et différenciation) ainsi que dans la physiopathologie d'un modèle bien établi d'arthrite rhumatoïde. Aucun modèle induisant une sévérité sévère n'a été retenu. Ces résultats permettront de mettre en évidence le rôle de Bob1 dans des maladies auto-immunes et d'envisager cette molécule comme une cible thérapeutique.

Au total, nous avons prévus d'utiliser 212 souris, incluant 200 souris CD19-Rosa26-Pou2af1 générées dans ce projet. Il s'agit cependant d'une estimation haute puisque les objectifs (ie différences significatives) pourront être atteints avant ce nombre. La règle des 3R sera suivie de la façon suivante:

-Réduire: le nombre d'animaux retenu a été calculé afin de permettre une interprétation fiable, statistiquement justifiable, et suffisante des résultats. Les analyses effectuées seront guidées par des tests *in vitro* préalables. De plus, les modèles ont été choisis par leur robustesse même si des variabilités ne peuvent être écartées, inhérents à toute expérience *in vivo*.

-Remplacer : l'utilisation d'un modèle animal est justifiée par l'absence de système *in vitro* alternatif permettant de reproduire la complexité multicellulaire d'un organisme et les interactions cellulaires notamment dans le cadre de maladies immunes.

-Raffiner : des mesures antalgiques seront mises en œuvre afin de limiter la souffrance des animaux, les animaux seront suivis régulièrement. Tous les animaux seront analysés post-mortem pour caractériser la réponse immunitaire. Les animaux sont maintenus dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté. Le nombre d'animaux par cage est de 5 pour limiter le stress de la surpopulation ou de l'isolement. Des brindilles de papier sont placées dans la cage pour permettre aux souris de s'enfouir et se cacher. Si un mâle se retrouve dominant et attaque ses congénères, il sera isolé dans une cage individuelle.

16904 Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est un cancer cutané agressif, avec, au stade métastatique inopérable, une seule option thérapeutique efficace actuellement disponible.

Cependant, l'utilisation de ce traitement ne permet d'obtenir une réponse objective durable que chez 25% des patients soulignant la nécessité d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques dans ce domaine. Dans ce contexte, nous allons étudier un anticorps humain qui cible la membrane des cellules du CCM, anticorps couplé à une molécule chimique afin de former un complexe cytotoxique.

La cytotoxicité de ce complexe a pu être démontrée *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe utilisant une lignée cellulaire humaine de CCM (retard de croissance tumorale sans régression obtenu par une injection de 10 mg/kg/15 jours).

L'objectif du présent projet est d'optimiser le schéma thérapeutique du produit étudié dans le but de mettre en place un essai clinique de phase 1 chez l'Homme. Ce projet doit donc permettre de déterminer l'effet dose-réponse du traitement envisagé, la dose minimale efficace et la dose optimale permettant d'observer une réponse objective durable sur la régression tumorale en modèle de xénogreffe murin de lignées de CCM. De plus, cette étude permettra l'obtention d'informations préliminaires sur la tolérance du produit, permettant d'orienter une étude de tolérance à mener sur une seconde espèce de rongeur (rats).

Pour cela, le modèle murin de xénogreffe maîtrisé au laboratoire sera utilisé. Afin d'être au plus proche de la clinique et de mimer au plus la diversité des carcinomes à cellules de Merkel, l'efficacité de quatre doses (2, 5, 10 et 20 mg/kg) du nouveau bio-médicament, (10 souris/dose) sera testée sur 3 lignées cellulaires humaines différentes et environ 5 CCM issus de patients. La dose optimale déterminée sur

les 3 lignées servira de dose unique de traitement injecté au groupe expérimental. L'ensemble de ces groupes sera comparé à un groupe témoin. Au total, 170 souris seront donc utilisées.

Ce protocole suit la règle des 3R:

Réduction : La détermination du nombre de groupes et les doses testées sont basées sur les résultats des tests de cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* préalablement réalisés au laboratoire réduisant ainsi le nombre de souris utilisées.

Raffinement : Les souris seront dans des cages enrichies avec des maisonnettes en plexiglas et du papier absorbant. Du fait du statut immuno-déficient des souris, l'ensemble du matériel d'enrichissement sera stérilisé. La douleur et l'inconfort pouvant être subit durant ce projet par les animaux sont un maximum réduit.

Remplacement : Afin de montrer la dose minimale efficace et pour affiner au mieux le schéma thérapeutique du biomédicament permettant à terme la réalisation d'une étude de phase I, et dans le but de comprendre son interaction avec le milieu tumoral, sa toxicité, sa réponse sur la croissance tumorale médiée par la reconnaissance de la cible et son efficacité, le passage à un modèle *in vivo* est nécessaire.

16905 Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus dévastatrice.

Malgré une thérapie très agressive reposant sur une chirurgie associée à l'utilisation concomitante de la chimiothérapie et de la radiothérapie (Protocole de Stupp), le taux de survie des patients reste très faible (médiane de survie : 14,6 mois et survie à 1 ans < 30 %).

En effet, les propriétés invasives des cellules tumorales de GBM rendent son ablation complète impossible, conduisant alors à l'émergence de nouveaux foyers de prolifération, localisés à proximité de la zone de résection, et à une rechute rapide du patient.

Les radiothérapies provoquent une sénescence des cellules dans la zone péri-tumorale irradiée.

En biologie, la sénescence est un processus physiologique de vieillissement qui entraîne une lente dégradation des fonctions de la cellule à l'origine du vieillissement des organismes.

De nombreux travaux suggèrent que cette sénescence pourrait expliquer la radiorésistance des cellules et l'agressivité des récidives.

Pour étudier les effets de la radiothérapie, nous disposons d'un modèle de souris transgéniques dans lequel les cellules sénescents peuvent être mises en évidence avec une caméra qui détecte la bioluminescence qu'elles émettent.

Nous disposons d'un irradiateur couplé à un scanner qui permet une irradiation très localisée et précise d'une partie du cerveau d'une souris.

Une caméra bioluminescente nous permet de mettre en évidence la luminescence émise par les cellules sénescents.

Notre plate forme d'imagerie dispose d'une μ IRM (Imagerie par résonance magnétique).

Notre projet comporte 2 volets :

1) Etude de la sénescence des cellules endothéliales dans le tissu péri-tumoral irradié

- Une première étude permettra de tester une gamme de doses d'irradiation de la moitié du cerveau et d'effectuer une image bioluminescente du cerveau de chaque souris, chaque mois pendant 12 mois.

Il faudra 50 souris.

10 souris pour une dose

5 doses

Nous pourrons ainsi connaître à quelle dose et au bout de combien de temps est obtenu un pic de cellules sénescents.

- Une seconde étude analysera histologiquement et biochimiquement les marqueurs de la sénescence dans les cerveaux au moment du pic défini par la première étude.

Il faudra 25 souris

5 souris pour une dose

5 doses

2) Modulation de la sénescence radio induite

Nous disposons d'un traitement qui permet l'élimination des cellules sénescents.

Comme précédemment, nous irradierons dans les conditions permettant d'obtenir un pic de cellules sénescents, les demi cerveaux de 2 groupes de souris.

Un groupe sera traité pour inhiber ce pic de cellules sénescents, le second ne le sera pas.

Les 2 groupes recevront une greffe intracérébrale de cellules de glioblastome.

Puis, les souris seront irradiées le jour suivant, le suivi s'effectuera par μ IRM (Imagerie par résonance magnétique.) sur une plate forme d'imagerie du petit animal et nous ferons une étude de la survie.

6 groupes de souris

- 1 groupe témoin non irradié non traité,
- 1 groupe témoin non irradié traité,
- 2 groupes irradiés à 2 doses différentes et non traités,
- 2 groupes irradiés à 2 doses différentes et traités.

60 souris seront nécessaires pour cette étude et l'expérience sera renouvelée 3 fois.

Soit 180 souris.

Au total, ce projet nécessitera 255 souris.

Le modèle animal est indispensable et non substituable pour de telles études, avant de commencer des études chez l'homme.^[L]_[SEP]

Règle des 3R:

- Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant des images qui permettent de suivre le même animal dans le temps tout en conservant le nombre de souris nécessaires pour un résultat statistique significatif.

Le nombre d'animaux pour cette saisine prend en compte cette règle.

- Raffiner en maintenant les souris par groupe de 5/ cage enrichie (frisottis) et en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique ainsi qu'en fixant des points limites stricts qui conduisent à la mise à mort.^[L]_[SEP]

Nous assurerons une anesthésie et une analgésie si nécessaire pendant chaque procédure.

16906 Les fibroses sont des maladies dues à la formation excessive de tissu conjonctif fibreux en réponse à une atteinte tissulaire souvent inflammatoire. Elles se traduisent par une rigidité anormale des organes, au premier rang desquels les poumons, mais aussi le foie, les reins, le cœur..., pouvant avoir à terme, des conséquences létales. La fibrose pulmonaire idiopathique (c'est-à-dire sans cause connue) se manifeste généralement après 60 ans. Elle touche environ 17000 personnes en France et 3 millions dans le monde. Les fibroses limitent l'espérance de vie des patients à moins de 2 ans après le diagnostic. Le traitement actuel des stades légers à modérés repose sur deux molécules qui ralentissent la progression de la rigidification des poumons mais qui ne soignent pas.

Une société privée avec laquelle nous collaborons a mis au point, d'une part, des molécules permettant potentiellement de traiter cette fibrose, d'autre part, un modèle de fibrose pulmonaire chez la souris. De notre côté, nous avons démontré, sur différents organes et en particulier le poumon, la robustesse d'une nouvelle méthode d'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour cartographier les propriétés mécaniques des tissus imagés. Le présent projet se propose d'utiliser cette nouvelle méthode pour caractériser mécaniquement la fibrose dans le modèle ci-dessus cité. Le but est de proposer, à terme, une méthode non invasive et transposable à l'humain qui permette un suivi au cours du temps des effets traitements administrés sur la rigidité des organes.

L'IRM permet, par rapport à des méthodes classiques d'investigation, de minimiser le nombre d'animaux nécessaires dans les études précliniques, ce qui va dans le sens de la règle des 3R.

Seule une étude comparative entre des souris saines et des souris ayant des poumons fibrotiques peut permettre de valider ou d'invalider la pertinence de l'examen IRM pour quantifier le degré d'affection de poumons fibrotiques et localiser l'affection dans les poumons afin, à terme, de transposer cette méthode en clinique et de suivre et guider la thérapie mise en œuvre.

Le présent projet portera uniquement sur des animaux atteints de fibrose pulmonaire et sur des animaux sains. Chacun passera un seul examen IRM qui sera complété par une étude histologique. Au regard des études précédentes, le nombre d'animaux, 30 souris, a été réduit à son minimum pour conduire à des résultats significatifs qui permettent d'éprouver et de valider, le cas échéant, la pertinence de la nouvelle technique. Chaque animal aura un examen IRM d'une heure.

Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation (les animaux disposant de nourriture et d'eau ad libitum ; milieu enrichi ; possibilité pour chaque animal de s'isoler de ses congénères (igloo kleenex) et de créer des habitats, comme en milieu naturel).

Tout au long de l'étude, tout sera mis en œuvre pour éviter stress et souffrance. L'état de santé des animaux sera étroitement surveillé tout au long des expériences par du personnel qualifié et un vétérinaire et dans l'éventualité d'un signe non traitable, des critères d'arrêt sont prévus...

16907 La maladie de Rendu-Osler (RO) ou HHT (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia) 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 dans les cas les plus graves, par des malformations artério-veineuses (jonction directe entre veines et artères) au niveau du foie, des poumons et du cerveau. Il s'agit d'une maladie génétique rare impliquant plusieurs gènes. En effet, chez les patients RO, des mutations ont été rapportées sur les gènes (ACVRL1 et ENG) codant respectivement pour ALK1 et l'endogline. ALK1 est un récepteur spécifique des cellules endothéliales (cellules qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins) et l'endogline est son corécepteur. Ces deux protéines sont directement impliquées dans l'angiogenèse (formation des néo-vaisseaux à partir de vaisseaux existants). Ce processus est normal dans le développement du réseau vasculaire mais il est également impliqué dans un certain nombre de pathologies (dissémination des métastases lors des cancers, dégénérescence maculaire liée à l'âge...). Chez les modèles rongeurs, la destruction du gène ALK1 entraîne la mort suite à de graves défauts vasculaires.

La protéine BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9) qui se fixe à ce récepteur est un facteur de croissance. L'objectif de ce projet est de mettre au point une technique permettant de visualiser les malformations artério-veineuses dans des modèles rongeurs qui n'ont plus ce facteur de croissance. Le développement de ce modèle animal permettra ensuite de tester des molécules identifiées *in vitro* possédant un potentiel thérapeutique dans le traitement de ces malformations. Pour réaliser ce projet, nous utiliserons des rongeurs qui n'expriment pas Bmp9 et présentent des caractéristiques proches de la maladie de Rendu-Osler.

Il est attendu que ces caractéristiques de malformations artério-veineuses 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 essentiel. Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude. Les animaux sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. Nous veillerons à n'utiliser que le nombre minimum nécessaire d'animaux, estimé à 178, pour assurer la validité des résultats.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi et des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis pour éviter toute souffrance et stress 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 d'une euthanasie.

16908 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des affections digestives chroniques graves souvent associées à des atteintes extra-intestinales notamment orales telles que des aphtes, des caries et des maladies parodontales (MP). La MP est une inflammation d'origine infectieuse des tissus de soutien des dents qui aboutit, sans traitement, à la perte des dents. Les patients atteints de

MICI présentent un risque 2 à 7 fois plus élevé de MP. Les seules données françaises à ce jour sur le sujet obtenu récemment confirment ce constat et suggèrent de plus une corrélation entre l'inflammation gingivale et l'activité de la MICI. Cependant, le rationnel biologique de cette association est mal connu. L'existence d'anomalies communes de la réponse immune et le rôle du microbiote oral et intestinal sont des pistes potentielles. Les modèles expérimentaux permettent de vérifier ces hypothèses en contrôlant certains facteurs causaux supposés. Le rat transgénique HLA-B27 est un excellent modèle pour réaliser notre étude puisqu'il présente une inflammation multi organes caractérisée notamment par une colite spontanée, une uvéite et une arthrite. Une destruction accélérée de l'os alvéolaire (l'os de soutien de la dent) est également observée dans ce modèle et suggère une susceptibilité accrue à la parodontite. Par ailleurs, les travaux récents ont montré qu'il existe une évolution parallèle entre l'inflammation orale et intestinale chez les rat HLA-B27, et ce d'une manière spontanée. Nous émettons donc l'hypothèse d'un lien causal entre MICI et MP et notre projet a pour but d'élucider les mécanismes biologiques de cette association. Une meilleure compréhension de ces mécanismes est important pour améliorer à terme la prise en charge des MP chez les patients atteints de MICI.

Dans ce but, l'étude va durer 10 semaines, les animaux seront étudiés à 8, 12 et 18 semaines de vie pour comparer l'évolution des deux maladies à différents stades. Les organes seront prélevés et analysés par différentes méthodes pour visualiser la réponse inflammatoire, immunitaire et les changements histologiques et radiologiques. Le nombre total d'animaux sur les 5 ans à venir est estimé au maximum à 100 rats (la moitié étant transgénique) pour trois groupes, soit 15-16 rats non-transgéniques et 17 rats transgéniques par groupe. Nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3R "Remplacer, Réduire, Raffiner":

- Nous avons réduit le nombre de rats nécessaire à celui requis pour obtenir une puissance statistique validante des résultats.

- L'étude a été raffinée en concevant la mise en place d'un suivi rigoureux des rats tout au long du protocole, en mesurant le poids des rats et en contrôlant la qualité des selles. De plus, l'observation du bien-être des animaux sera évaluée de façon bi-hebdomadaire en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur au moyen du score des grimaces.

- Il n'existe aucun moyen de remplacer un tel projet qui englobe l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique et systémique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet du lien entre les deux maladies depuis leurs phases les plus précoces.

16909 L'arthrose, maladie articulaire dégénérative est une cause majeure de douleur et d'incapacité chez les personnes âgées. L'arthrose n'est pas simplement un processus d'usure, mais plutôt un remodelage anormal des tissus articulaires induit par des médiateurs inflammatoires. Il n'existe, à ce jour, aucun traitement capable d'enrayer l'évolution du processus arthrosique. Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) ont récemment été proposées comme une approche thérapeutique pertinente pour prévenir la dégénérescence articulaire, par la sécrétion de facteurs thérapeutiques solubles. Ces facteurs qui possèdent des propriétés immuno-modulatrices, anti-apoptotiques, anti-fibrotiques et anti-inflammatoires jouent également un rôle dans la protection des cellules contre le stress oxydatif et la sénescence. Une atténuation significative de la progression de la maladie et une inhibition de l'inflammation ont été obtenues à la suite d'injections intra-articulaires (IA) de CSM dans des modèles animaux d'arthrose. Chez l'homme, des IA de CSM dérivées de la moelle osseuse et du tissu adipeux ont conduit à une réduction de la douleur dose-dépendante chez les patients arthrosiques. Cependant, il a été mis en évidence que ces injections intra-articulaires de CSM présentent des limites importantes : (i) une mort cellulaire massive liée au cisaillement résultant des forces de compression appliquées aux cellules lors de l'injection et (ii) un risque de fuite des cellules en dehors de l'espace articulaire. L'encapsulation des CSM dans des biomatériaux est une approche qui permet de contourner ces limitations et d'améliorer ainsi leur utilisation thérapeutique. Dans ce contexte, nous souhaitons déterminer si l'injection intra-articulaire de CSM associées à un hydrogel cytoprotecteur est une stratégie thérapeutique pertinente pour prévenir l'arthrose.

Nous avons développé une technique permettant de générer des particules d'alginate injectables et d'y encapsuler des CSM. La viabilité et les propriétés anti-inflammatoires des cellules encapsulées ont également été démontrées *in vitro*. Nous souhaitons maintenant déterminer si des cellules encapsulées

dans un biomatériau permettent une atténuation de la progression de l'arthrose par administration intra-articulaire de CSM.

Dans un premier temps, l'arthrose sera induite chez 24 lapins par section chirurgicale du ligament croisé crânial du genou droit. Huit semaines plus tard, une injection intra-articulaire de cellules libres ou encapsulées sera réalisée dans le grasset pathologique chez ces lapins arthrosiques, répartis en 4 groupes :

- Groupe 1 : sham : contrôle négatif de l'injection intra-articulaire avec une solution physiologique phosphatée qui sert d'excipient au CSM (6 lapins)
- Groupe 2 : injection de CSM non encapsulées (6 lapins)
- Groupe 3 : injection de particules d'alginate sans CSM (6 lapins)
- Groupe 4 : injection de CSM encapsulées (6 lapins)

Le devenir des cellules ainsi que l'impact de l'injection sur l'évolution de l'arthrose seront évalués post-mortem par imagerie et par histologie 6 semaines après injection.

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%).

-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, boule métallique, bloc de foin compacté) 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 a priori : infection du site opératoire résistant à l'antiseptie locale et à l'antibiothérapie, douleur ne rétrocedant pas au traitement analgésique de secours, maladie respiratoire ne rétrocedant pas à un traitement antibiotique (Souffrance durable « dommages irrémediables »).

16910 Les cardiomyopathies sont des pathologies hétérogènes touchant le muscle cardiaque. Elles sont caractérisées par la destruction de nombreux cardiomyocytes, conduisant à une altération de la fonction cardiaque et in fine à insuffisance cardiaque sévère. Des mutations sur le gène LMNA sont retrouvées dans 10 % des cas de cardiomyopathies et sont à l'origine de cardiomyopathies sévères à progression rapide. Le facteur de croissance fibroblastique FGF10 a été identifié comme une cible thérapeutique potentielle pour la régénération cardiaque dans les cardiomyopathies d'origine ischémique. Notre projet a pour but d'étudier le rôle du gène Lmna dans le cœur postnatal en cours de maturation et l'impact du traitement par FGF10 sur la progression de la pathologie cardiaque liée à l'inactivation du gène Lmna. Pour cela la délétion conditionnelle du gène Lmna spécifiquement dans le cœur sera effectuée grâce à l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques particulier. Ces souris seront traitées par FGF10 qui sera administré par injection intra-veineuse. Le phénotype cardiaque sera évalué par échocardiographie. Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude de cellules cardiaques en culture ne permet pas d'analyser la fonction cardiaque et les interactions cellules-cellules telles qu'elles sont situées dans le cœur entier. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension

des mécanismes impliqués dans les maladies humaines. La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera 240 souris. Cette étude sera réalisée 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). Afin de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées par groupe de 3 à 5 animaux dans des cages dont l'environnement est enrichi à l'aide de maisonnettes en carton ou de papier kraft. Nos souris feront l'objet d'une surveillance quotidienne afin de détecter précocement les points limites de souffrance. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

-Remplacer : l'utilisation de modèles *in vivo* est nécessaire pour analyser la fonction cardiaque. Il n'existe pas actuellement de modèles *ex vivo* ou *in vitro* permettant de récapituler l'ensemble des conséquences des cardiomyopathies.

-Réduire : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence des anomalies de la fonction cardiaque. De plus, cette étude de type longitudinale permet de suivre les animaux au cours du temps ce qui réduit le nombre d'animaux utilisés.

-Raffiner : afin d'améliorer le bien-être animal au cours de notre étude, les besoins physiologiques des animaux seront respectés (nourriture ad libitum, cages propres, enrichissement, stabulation en groupe). Des points limites clairs seront définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption.

16911 Les affections ostéoarticulaires chroniques sont la première cause de morbidité au monde en touchant environ 20% de la population et tout particulièrement les adultes de plus de 50 ans. Ces pathologies fortement invalidantes se manifestent de façon aiguë et chronique entraînant des douleurs intenses et des pertes de fonctionnalité.

L'arthrose est causée par la dégénération des articulations due à une usure progressive du cartilage. En plus de cette usure, l'arthrose est associée à un remodelage des os sous cartilagineux, la formation d'excroissances osseuses (les ostéophytes), un affaiblissement des ligaments et des muscles et dans les cas les plus sévères, une inflammation articulaire.

Les traitements médicamenteux des maladies rhumatismales sont basés principalement sur le soulagement de la douleur intense et de l'inflammation : traitements antalgiques et analgésiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens ou anti-inflammatoire de type corticoïdes. Si l'inflammation peut être contrôlée chez certains patients, il n'existe malheureusement à ce jour, aucun traitement permettant de guérir la douleur chronique ou la dégradation du cartilage. Cela s'explique par une variabilité des manifestations cliniques entre chaque patient. La mise au point de nouveaux traitements permettant d'agir de façon globale contre les rhumatismes chez l'ensemble des patients est donc une urgence médicale.

Aujourd'hui, seuls les traitements chirurgicaux permettant de réduire les contraintes mécaniques induisant les lésions cartilagineuses montrent une efficacité. Toutefois, ces traitements sont très invasifs. La combinaison des 2 traitements (médicamenteux et chirurgical) pourrait avoir un intérêt pour améliorer l'efficacité des traitements chirurgicaux et réduire le caractère invasif de ces derniers

Le but de cette saisine est donc, dans un premier temps, de mettre au point un modèle d'arthrose induite par chirurgie chez le rat, selon les modèles largement décrit dans la littérature (procédure n°1).

Notre société étant une CRO qui mène des études pour l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire et biotechnologique, le deuxième objectif de la présente saisine est d'évaluer de nouveaux composés créés et développés par nos clients pouvant cibler un maximum d'effets pathologiques liés aux rhumatismes tels que l'inflammation, l'atteinte osseuse et l'atteinte cartilagineuse mais aussi la douleur (procédure n°2). Le troisième objectif sera d'associer un traitement médicamenteux à une procédure chirurgicale (procédure n°3). Ces deux dernières procédures sont des procédures générique (vu avec la DSV, le CEEA et le MESR pour la soumission de saisines génériques) étant donné que nous ne connaissons pas à l'avance les différents composés qui seront à tester.

La saisine est donc divisée en 3 procédures qui compteront un total de 2620 rats :

Procédure expérimentale n°1 : Optimisation du modèle d'arthrose chez le rat basé sur ce qui est décrit dans la littérature. Le but étant de valider le modèle le plus proche de la pathologie humaine et de définir des composés de références appliqués en clinique. Nous évaluerons l'efficacité des différentes molécules de référence (anti-inflammatoire, viscosupplément, ...). La procédure 1 comptera 120 rats.

Procédure expérimentale n°2 : Une fois le modèle validé, les différents composés développés par nos clients seront testés et comparés à un produit de référence adapté. Les composés seront testés chez le rat immunocompétent ou immunodéficient (selon les composés à tester si ces derniers sont d'origine xénogénique ou non), en traitement préventif ou curatif, et appliqués selon les schémas thérapeutiques inhérent aux composés, dans le cadre d'études menées au sein de notre société. Selon notre historique, nous estimons mener 3 études par an, soit 15 études sur 5 ans. Sachant que 100 animaux sont utilisés par étude, nous estimons que 1500 rats seront utilisés sur 5 ans.

Les molécules seront évaluées sur leur efficacité contre l'inflammation, la résorption osseuse, la dégradation cartilagineuse et/ou la douleur.

Procédure expérimentale n°3 : Les différents composés développés par nos clients seront testés en complément d'un acte chirurgical et comparé au traitement chirurgical seul. Les composés seront testés chez le rat immunocompétent ou immunodéficient (selon les composés à tester si ces derniers sont d'origine xénogénique ou non), en traitement préventif ou curatif, et appliqués selon les schémas thérapeutiques inhérent aux composés, dans le cadre d'études menées au sein de notre société. Selon notre historique, nous estimons mener 2 études par an, soit 10 études sur 5 ans. Sachant que 100 animaux sont utilisés par étude, nous estimons que 1000 rats seront utilisés sur 5 ans. Les molécules seront évaluées sur leur efficacité contre l'inflammation, la résorption osseuse, la dégradation cartilagineuse et/ou la douleur.

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour :

Remplacer : la pathologie arthrosique 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 les rhumatismes pour éviter toute souffrance inutile et prolongée : les conditions d'hébergement seront optimisées (litière spécifique, augmentation de l'enrichissement, facilité d'accès à l'alimentation et ajout de nourriture appétente), nous utiliserons un anesthésique lors de l'induction de la pathologie, des traitements antalgiques pré et post induction et dès l'apparition des premiers signes inflammatoires. Un suivi quotidien des animaux sur des caractéristiques spécifiques (gonflement, locomotion et sensibilité mécanique) sera effectué. 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 des grilles de bien-être animal adaptées) sera euthanasié.

16912 La vaccination basée sur des sous-unités protéiques ou peptidiques issues d'agents infectieux ou de cellules tumorales représente une approche de choix pour protéger les populations vis-à-vis des micro-organismes infectieux ou des cancers car elle permet de déclencher la réponse immunitaire contre des sous-unités cruciales pour la neutralisation du pathogène ou de la tumeur. De plus, elle présente moins de risque d'induction d'effets secondaires que les vaccins basés sur des microorganismes entiers. L'efficacité de ce type de vaccination est cependant limitée par la faible immunogénicité intrinsèque des sous-unités. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer de nouvelles approches permettant d'augmenter l'immunogénicité afin de produire des vaccins sous-unitaires plus efficaces.

Les approches d'augmentation de l'immunogénicité qui seront évaluées sont issues de notre groupe de recherche ou ont été développées par d'autres scientifiques. Ces approches sont applicables à n'importe quelle sous-unité d'intérêt vaccinal. L'objectif est d'évaluer si ces approches utilisées seules

ou en combinaison peuvent booster l'immunogénicité. Pour évaluer ces questions, nous utiliserons des sous-unités dérivées de protéines modèles, de microorganismes infectieux ou de tumeurs. Cet objectif ne peut être atteint sans se passer de l'animal car, à ce jour, aucune technique *in vitro* ne permet de reproduire efficacement l'ensemble des conditions nécessaires au déclenchement de la réponse immunitaire qui se déroule au sein d'un animal.

Les animaux étudiés (1280 rongeurs) dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux. Dans la mise en place de nos plans d'expérience nous serons attentifs à la règle des 3R afin de n'utiliser que le nombre minimum d'animaux nécessaire pour assurer la validité des résultats.

16913 La maladie de Pompe est une maladie lysosomale génétique fatale due à une anomalie de fonctionnement de l'alpha-1,4-glucosidase acide (GAA), une enzyme lysosomiale qui hydrolyse le glycogène en glucose. La déficience en GAA entraîne donc une accumulation importante de glycogène dans les lysosomes des cellules de différents organes (cœur, muscles squelettiques, système nerveux central...). Elle se manifeste par une faiblesse musculaire progressive (myopathie) et des difficultés respiratoires en fonction de l'âge d'apparition de la maladie. Ainsi, chez les enfants atteints de la forme précoce ou forme infantile, le muscle du cœur est gravement touché entraînant des troubles cardiaques sévères. En l'absence de traitement, ces enfants meurent dans les deux premières années de vie à cause d'une insuffisance cardio-respiratoire.

Malgré le développement au cours des dernières décennies de biothérapies comme les enzymes recombinantes humaines, la maladie de Pompe souffre d'une absence de prise en charge thérapeutique importante. En effet, l'efficacité thérapeutique de ces macromolécules dépend fortement de leur capacité à accéder aux organes et/ou cellules cibles. Or, du fait de leur poids moléculaire très élevé, ces molécules ont une faible distribution tissulaire notamment dans des organes possédant une barrière physiologique étanche avec le sang comme le cerveau. Cela a pour conséquence une absence totale ou partielle de ces enzymes dans certains organes et limite fortement l'efficacité du traitement à long terme. Afin de surmonter ces limites, nous avons développé de nouvelles méthodes de vectorisation permettant d'augmenter la distribution tissulaire des protéines recombinantes humaines. Ainsi, en les couplant à un système de transport spécifique au niveau des barrières physiologiques, nous avons réussi à les faire rentrer dans des organes jusqu'à maintenant inaccessibles ou difficilement accessibles.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet thérapeutique de ces nouvelles molécules dans des modèles transgéniques murins de la maladie de Pompe.

L'efficacité de ces molécules sera évaluée dans un premier temps *in vitro* dans des modèles cellulaires, organotypiques ou biophysiques. Ils permettent donc de présélectionner les meilleurs candidats médicament. Cependant, ces modèles bien que reproduisant certaines caractéristiques de la maladie humaine, ne permettent pas de prendre en compte la complexité et l'interaction de l'intégralité des systèmes biologiques, en particulier la coexistence de plusieurs barrières physiologiques et les différentes voies de métabolisme. L'évaluation complète de l'effet thérapeutique de ces nouvelles molécules vectorisées ne peut être faite qu'avec des modèles *in vivo*. Les études dans le modèle transgénique de la maladie permettent donc de s'assurer que les effets thérapeutiques de nouvelles biothérapies sont évalués dans un organisme entier et complexe, possédant ainsi de façon intégrée tous les paramètres comportementaux, biochimiques et pathophysiologiques de la maladie humaine. Jusqu'à présent, il n'y a pas de méthode alternative à l'utilisation de l'animal pour évaluer les aspects mentionnés.

Les produits sont administrés par les voies systémiques classiques (intra-veineuse, intra-péritonéale...) à des doses qui ne doivent pas induire d'effets secondaires. En fonction du stade de la pathologie, le traitement peut être chronique ou aigu. Les effets thérapeutiques seront évalués dans un premier temps en utilisant une batterie de tests comportementaux explorant les fonctions locomotrices, le domaine neuromusculaire et les fonctions cognitives. Dans un deuxième temps, les biomarqueurs d'engagement

de la cible et d'efficacité thérapeutique ainsi que la quantité du produit testé pourront être mesurés par des dosages dans le sang ou éventuellement le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les organes d'intérêt (prélèvements terminaux en fin d'étude sous anesthésie).

Toutes ces données permettront de valider la preuve de concept et de sélectionner les meilleurs candidats pour des études de sécurité préclinique et éventuellement pour des études cliniques.

Les gestes d'administration et de prélèvements peuvent provoquer un inconfort léger et de courte durée. Les tests comportementaux peuvent aussi générer un léger stress ou inconfort due à la nouveauté et/ou la manipulation. Des phases de handling, d'habituation à l'environnement et à l'appareillage, ainsi qu'un nombre limité de tests à passer, sont mis en place pour diminuer l'inconfort sans remettre en cause les résultats du projet. Pour les animaux transgéniques des points limites en plus sont identifiés afin de limiter l'inconfort ou le stress liés au modèle pathologique.

A la demande du scientifique, un support du service biostatistiques sera apporté aux expérimentateurs pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études. Les prélèvements de liquide et tissus biologiques de ces études seront utilisés pour mesurer des biomarqueurs secondaires, ainsi la caractérisation complète des composés étudiés ne nécessitera de faire une étude supplémentaire.

La manipulation d'animaux, les techniques d'administration et de prélèvement sont réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec de l'enrichissement et des interactions quotidiennes avec le personnel. De plus des points limites spécifiques sont identifiés pour les modèles pathologiques afin de limiter la contrainte liée au développement des pathologies.

Le nombre maximal d'animaux utilisés dans ce projet sera de 1725 souris sur une période de 5 ans.

16914 Le cortex cérébral est un tissu dont la surface est extrêmement plissée, formant des circonvolutions appelées parfois 'sillons' dont la forme et les motifs sont une signature unique de l'individu, au même titre que les empreintes digitales. Par ailleurs il a aussi été montré que ces plis et leurs motifs peuvent être perturbés par la maladie et donc peuvent en être des marqueurs. Cependant, la très grande variabilité de motifs entre les individus rend la tâche difficile par exemple pour distinguer un motif 'sain' d'un motif pathologique. Le mécanisme de formation de ces plis lors du développement doit donc être étudié pour comprendre cette variabilité apparente. Chez les primates dont le cortex est plissé (singes de l'ancien monde, grands singes, humains), le plissement du cortex se fait entre la moitié et la fin de la gestation, avec des changements importants d'une semaine à l'autre. A la naissance, la presque totalité des motifs de plissement observables à l'âge adulte le sont déjà. Il est donc impératif, afin de le comprendre, d'observer et de quantifier l'évolution du plissement cortical pendant la deuxième moitié de la gestation, à un rythme d'au moins une fois par semaine. L'outil privilégié pour une telle observation est l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Il n'est pas possible pour des raisons légales d'effectuer une telle étude sur des femmes enceintes sans pathologie. Cependant, grâce à leur proximité phylogénétique avec les humains, les primates non-humains (PNH) peuvent nous permettre de comprendre ce mécanisme commun de plissement cortical pré-natal. L'objectif de ce projet est donc d'effectuer une étude sur 10 femelles babouin (*Papio Anubis*) gestantes et par conséquent sur leur fœtus, afin d'observer longitudinalement par IRM le développement cérébral à la fréquence d'une acquisition par semaine, ce qui constituera une observation unique à ce jour. Pour ce projet 20 femelles gestantes seront échographiées afin d'en sélectionner 10 qui seront au bon stade de gestation au moment des acquisitions. Le projet inclut donc N=30 animaux (20 femelles et 10 fœtus).

La règle des 3R est respectée. Remplacement: pour les raisons explicitées ci dessus, le seul modèle possible est le primate non-humain avec un cortex plissé. Réduction: chacune des 10 femelles aura 10 images ce qui nous permettra de constituer une base de données de 100 images. La variabilité inter-sujets chez l'humain est telle qu'on estime qu'il faille au moins 50 sujets pour obtenir des statistiques robustes. Cette variabilité est inférieure chez le babouin, nous avons réduit le nombre de sujets à 10, ce qui est cependant un minimum pour observer des motifs de plissement variables. Raffinement: le stress induit pour les femelles gestantes sera réduit autant que possible (capture sans contention, transport dans le noir), l'anesthésie est optimisée pour supprimer toute neurotoxicité, et des tests comportementaux seront effectués 6 mois après la naissance pour valider l'absence d'effet indésirables

sur le fœtus en développement. Ce raffinement a été mis au point lors d'une étude préliminaire déjà effectuée sur une femelle et son foetus, ce qui a permis de vérifier la viabilité de l'expérience et l'absence d'effet délétère sur le foetus.

16915 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, la protéine X du Bornavirus, 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, les souris SOD1G93A. Dans cette étude, l'administration de la protéine X 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 la protéine X dans les motoneurons et jusqu'à la mitochondrie semble être déterminant dans les effets neuroprotecteurs induits. Le présent projet vise à accroître le potentiel neuroprotecteur de la protéine X en optimisant le mode d'administration de cette protéine et en favorisant son adressage à la mitochondrie. Pour cela, une protéine X modifiée génétiquement pour son adressage à cette organelle sera administrée dans les motoneurons 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). La progression de la maladie chez ces animaux sera comparée à celle d'animaux contrôles ayant reçu une protéine X sauvage ou une protéine X mutée pour réprimer son adressage à la mitochondrie. Nous pensons que la réalisation ce projet sera d'un intérêt majeur car il pourrait permettre d'accroître le potentiel thérapeutique de la protéine X 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 la protéine X 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. Pour chaque condition expérimentale seront testés : 2 moyens d'injection du traitement préclinique, 3 traitements différents (la protéine sauvage et deux formes mutées). Par ailleurs la maladie évoluant différemment suivant le sexe, des groupes mâles et femelles séparés seront réalisés pour chaque condition expérimentale. Au total 2376 animaux seront utilisés sur une période de 5 ans. 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. Lors des techniques invasives impliquant une chirurgie, des soins pré-opératoires (analgésie) et post-opératoires immédiats seront dispensés (lutte contre l'hypothermie et la déshydratation oculaire). Une surveillance sera ensuite dispensée en contrôlant la douleur par des analgésiques et la reprise alimentaire de l'animal

16916

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. Les protocoles de protonthérapie sont constamment réétudiés pour améliorer l'efficacité du traitement. Dans notre établissement, un nouveau protocole a été mis en place. Il doit permettre d'améliorer la qualité du ciblage de la dose et donc d'améliorer l'efficacité du traitement sur la tumeur.

Ce projet a pour objectif d'étudier ce nouveau protocole pour permettre une meilleure prédiction des effets secondaires de la protonthérapie. Dans le cadre du projet, des études *in silico* ainsi que des études *in vitro* ont été réalisées pour obtenir un maximum de données préliminaires. Il est maintenant indispensable de poursuivre les études chez un modèle vivant, intégré et autonome.

Deux séries de 40 souris saines seront irradiées in toto avec deux conditions de traitement différentes. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 80 souris. Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Avec une irradiation aux doses prévues par le projet on s'attend à observer deux types de syndromes :

- un effet gastro-intestinal lié à la perte de l'intégrité de l'épithélium intestinal (ce qui va se traduire par des diarrhées)
- une aplasie médullaire

Une grille de score va nous permettre d'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 granules disposés directement dans le fond de leur cage. L'accès à la nourriture sera ainsi plus aisé.

Par ailleurs, les conditions d'hébergement des animaux sont 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.

16917 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. De nombreuses solutions thérapeutiques existent actuellement pour favoriser la régénération osseuse, mais elles présentent toutes des limites et des risques (comorbidité, contamination, rejet de greffe...). Un des challenges majeurs de l'ingénierie tissulaire osseuse est de générer de nouveaux substituts osseux aux propriétés optimisées. Des études menées au laboratoire ont montré que le microenvironnement créé par l'assemblage de cellules et de matrice leur servant de support conditionnait fortement le devenir de ces cellules et l'efficacité thérapeutique des substituts. Afin de mieux contrôler l'assemblage en trois dimensions des différents éléments des produits d'ingénierie tissulaire, des technologies de bio-impression se sont développées. Parmi elles, la Bioimpression Assistée par Laser (LAB) présente des atouts majeurs tels qu'une grande vitesse d'écriture, une viabilité des cellules élevée et une haute résolution.

La station actuelle de bioimpression développée par le laboratoire permet l'impression de cellules vivantes et de biomatériaux *in vitro* et *in vivo* avec une résolution micrométrique. Des expérimentations menées au laboratoire ont démontré l'impact de l'organisation spatiale cellulaire sur la réparation et la vascularisation osseuse par LAB *in vivo*. Cependant, cette station créée en 2010 ne satisfait pas la totalité de nos exigences dans notre volonté de fournir une maîtrise automatisée de l'ensemble du processus, pour orienter cette technologie vers une application clinique.

En ce sens, le laboratoire vient d'acquérir un modèle de Bio-imprimante Nouvelle génération (NGB). Cet appareil a pour rôle de s'affranchir des limites techniques inhérentes à la plateforme actuellement

en service, afin d'assurer une maîtrise de la reproductibilité et de la répétabilité des protocoles mis en place au laboratoire. Le but est de générer des performances satisfaisant les critères d'éligibilité à l'obtention d'une certification d'assurance qualité.

Ici, l'objectif des nouvelles expérimentations envisagées est d'étudier, dans la continuité des résultats publiés, l'influence du motif d'impression sur la réparation et la vascularisation osseuse associée à divers substrats. Ces expérimentations s'appuieront sur des modèles *in vitro* obtenus par LAB mis au point et caractérisés dans notre laboratoire, sur l'ancienne et la nouvelle station de bio-impression.

Des cellules primaires humaines et/ou des substrats minéralisés ou organiques biocompatibles seront imprimés par LAB *in situ* au niveau de lésions osseuses critiques du calvarium (partie supérieure de l'enveloppe osseuse du crâne) chez des souris immunodéficientes. Ce modèle permet de réaliser un suivi longitudinal des cellules du fait de sa position superficielle. L'utilisation de microtomographie (technique d'imagerie non destructrice utilisée ici pour retranscrire le volume osseux) permettra également d'imager *in vivo* la réparation osseuse, sans sacrifice des animaux. Les informations recueillies par ces méthodes non invasives seront complétées par des analyses sur tissus prélevés après sacrifice des animaux, les caractéristiques fines du tissu osseux néo-formé seront évaluées à 2 mois (point final de l'expérimentation).

Remplacement : aucune méthode *in vitro* ne permet d'étudier simultanément la vascularisation et la formation osseuse induites par des produits d'ingénierie tissulaire en trois dimensions avec un régime de flux dynamique.

Réduction : ces expériences sont conçues pour limiter le nombre d'animaux à 10 au maximum pour chacune des conditions expérimentales, en utilisant des tailles de groupes basées sur des travaux antérieurs et sur le nombre minimum d'animaux requis pour générer des résultats exploitables de manière statistique. De plus, 3 souris par condition expérimentale seront destinées à être sacrifiées à des temps plus précoces. Au total, 130 souris seront utilisées. Les méthodes d'imagerie utilisées permettent de réduire significativement le nombre d'animaux, pour le suivi des cellules et de la formation osseuse.

Raffinement : Une analgésie adaptée sera appliquée en pré- et post-opératoire ainsi que des conditions de stabulation appropriées (isolement des animaux jusqu'à cicatrisation de la suture cutanée de façon à éviter la réouverture de l'incision). Les souris seront ensuite replacées en fratrie avec des conditions d'hébergement et un milieu d'enrichissement adaptés, favorables au bien-être de l'animal (coton pour nidification, litière avec copeaux de peuplier, tuyaux pour jouer). Des points limites seront définis afin de respecter le bien-être animal et pourront entraîner l'arrêt immédiat des manipulations.

16918 Malgré des efforts considérables, la tuberculose (TB) reste un problème majeur de santé publique. Un vaccin efficace contre la TB n'est toujours pas disponible et des souches multi-résistantes de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), résistantes à la fois aux antituberculeux de première ligne isoniazide et rifampicine, émergent continuellement. Encore plus inquiétant pour l'avenir, on estime que 10% des personnes atteintes de TB multi-résistante ont aussi une TB ultra-résistante, c'est-à-dire résistante à l'isoniazide, à la rifampicine, aux fluoroquinolones et à un des trois antibiotiques de seconde intention (kanamycine, amikacine ou capréomycine). La TB pharmacosensible peut être traitée par un traitement de 6 mois, associant jusqu'à 4 antibiotiques. Cependant, la capacité à guérir la TB multi- et ultra-résistante est plus difficile, nécessitant des traitements allant jusqu'à 2 ans avec des médicaments de deuxième et de troisième ligne plus toxiques, souvent avec un succès limité. De nouvelles stratégies sont donc nécessaires pour prévenir l'émergence des résistances, raccourcir la durée du traitement et limiter les effets secondaires associés au traitement. Récemment, les approches dirigées par l'hôte sont apparues comme une stratégie prometteuse à utiliser en complément des antibiotiques existants ou futurs. MTB manipule les voies de signalisation de l'hôte pour subvertir le système immunitaire. Il pourrait ainsi être possible de reprogrammer le système immunitaire de l'hôte pour mieux contrôler ou même tuer les bactéries intracellulaires. Dans le but de tester cette hypothèse *in vitro*, nous avons incubé des cellules infectées par MTB, avec des molécules impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de l'hôte. Nous avons ainsi identifié des composés qui inhibaient la croissance intracellulaire de la bactérie.

L'objectif de notre projet est d'évaluer l'efficacité de ces composé *in vivo*, dans un modèle murin de la TB. La souris reste un modèle indispensable dans l'étude de la réponse immunitaire à l'infection et constitue une étape importante pour l'évaluation de l'efficacité de nouveaux composés. La pharmacocinétique (étude du devenir du médicament dans l'organisme) et la pharmacodistribution (distribution du médicament au niveau du site infectieux) ne peuvent pas être évaluées *in vitro*. Trois procédures expérimentales de sévérité modérée seront nécessaires pour la réalisation de ce projet. Brièvement, nous testerons d'abord la toxicité de nos composés en injectant des doses croissantes à des souris adultes (âge > 6 semaines). Des molécules similaires sont actuellement testées par d'autres groupes dans le traitement de cancers et n'ont pas montré de toxicité sévère. Si les composés s'avèrent non toxiques pour l'animal, nous évaluerons leur efficacité pour traiter l'infection de souris infectées par MTB par voie aérosol. Le traitement (par voie intrapéritonéale ou par voie orale) débutera après 3 semaines d'infection et durera pendant 2 semaines. Après mise à mort des animaux, le nombre de bactéries sera dénombré dans différents organes et un examen histopathologique sera réalisé. Enfin, nous évaluerons si l'utilisation conjointe de nos composés avec des antibiotiques améliore l'efficacité du traitement anti-tuberculeux.

Notre projet respectera scrupuleusement la règle des 3R :

Remplacement : ne seront étudiées *in vivo* que des composés qui ne sont pas toxiques pour des cellules en culture et qui auront prouvé leur efficacité *in vitro* pour contrôler la croissance de MTB.

Réduction : Nous estimons à 1005 souris le nombre maximal de souris auxquelles nous aurons recours pendant 5 ans, estimation qui rend compte de notre expérience et de notre volonté de minimiser au maximum le nombre de souris par groupe, tout en gardant un pouvoir statistique suffisant. Un biostatisticien a été consulté pour s'assurer qu'un nombre minimum d'animaux soit utilisé pour atteindre l'objectif fixé.

Raffinement : Les animaux sont hébergés et manipulés dans des isolateurs spécialement dédiés au sein d'une animalerie de confinement A3. Un suivi strict des animaux sera opéré tout au long de l'expérience via une observation quotidienne pour détecter tout changement physique ou comportemental tel la piloérection ou la parésie qui précèdent généralement une perte de poids. Les atteintes hépatiques et rénales seront évaluées par des tests sanguins. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Néanmoins si des animaux atteignent les points limites définis, ils seront euthanasiés avant la fin de la procédure.

Le bénéfice attendu de notre projet est une meilleure compréhension de la réponse immunitaire protectrice contre MTB et l'évaluation de l'efficacité de nouveaux composés dans le traitement de la TB.

16919 Le but de cette procédure est de tester, *in vivo*, l'efficacité de nouveaux composé contre le cancer, ayant prouvé leurs efficacités *in vitro*.

Les cancers du sein, du poumon, des ganglions et les sarcomes comptent parmi les cancers touchant le plus grand nombre de patients, avec une mortalité élevée. Un des soucis en clinique est de voir parfois régresser des tumeurscancéreuses suite à un traitement expérimental, sans toutefois réussir à prolonger significativement le temps de survie.

Au cours de ces vingt dernières années, nous nous sommes intéressés à la protéine TCTP (Translationally Controlled Tumour Protein), exprimée dans de nombreuses tumeurs, et nous avons pu démontrer *in vitro* que l'inhibition de l'expression de TCTP induit la reversion (ou regression) tumorale et/ou la mort programmée des cellules cancéreuses.

Il nous faut maintenant démontrer que cet effet peut être également obtenu *in vivo*, dans un modèle mammifère, et c'est ce modèle murin qui a été retenu car il reflète très bien un développement rapide de tumeur. Ce modèle murin consiste à injecter en sous-cutané (SC) une lignée (10E6 cellules) dérivée d'un sarcome de souris que nous avons nommée ITR1 (Inducible Tumor Reversion1). Cette lignée forme en 10 à 15 jours des tumeurs visible sous la peau. Quand la première souris développera une tumeur 2cm³, toutes les souris de ce groupe sera mis à mort par dislocation cervicale en même temps et autopsiés. La taille des tumeurs sera alors mesurée et si le composé s'avère être efficace, alors la taille des tumeurs sera inférieure dans le groupe traité par rapport groupe contrôle.

Ce modèle permet donc d'étudier une fonctionnalité tumorale, notamment de cibler une tumeur solide, que l'on retrouve chez l'Homme. A ce stade il n'est pas possible de remplacer l'animal du fait de la complexité des mécanismes en jeu dans la réversion tumorale et le test de molécules. Nous voulons tester si l'extinction de TCTP par ces nouvelles molécules permet la regression tumorale.

Les animaux seront suivis tous les jours et une grille de scoring sera mise en place prenant en compte la mesure des tumeurs mais également l'état général des animaux. Des points limites sont définis et tout animal atteignant un de ces points sera mis à mort. (Raffinement). A ce stade il n'est pas possible de remplacer l'animal du fait de la complexité des mécanismes en jeu dans la réversion tumorale et le test de molécules. Nous utiliserons pour cela un maximum de 525 souris et nous testerons maximum 7 composés (soit 75 animaux par composé à tester) (remplacement). Nous utiliserons un minimum de souris, mais suffisamment pour être statistiquement significatif (utilisant ANOVA comme test) (réduction).

16920 Le transfert et les impacts des éléments traces métalliques (ETM) sur un site des Hauts-de-France sont étudiés par le laboratoire Chrono-environnement depuis 2006. Les principaux résultats montrent (i) un transfert du cadmium (Cd) et du plomb (Pb) croissant le long du gradient de contamination et (ii) des impacts à différents niveaux d'organisation biologique touchant différentes espèces. Plus particulièrement, les recherches menées sur le site d'étude ont montré des effets sur la composition des communautés de micromammifères, sur des paramètres sanguins, sur la condition corporelle et sur l'état histologique de certains tissus.

Ce suivi, de plus de 10 ans, ainsi que les nombreux travaux des autres groupes de recherche, font du site d'étude un site pilote majeur pour comprendre l'évolution à long terme et à large échelle d'un site fortement contaminé. Le site possède par ailleurs des enjeux environnementaux, sanitaires et d'aménagement du territoire majeurs au vu de l'importante population humaine vivant dans les environs. Dans un contexte d'évaluation des risques écotoxicologiques et de biologie de la conservation, ce projet d'une durée d'un an s'intéressera aux variations individuelles de l'exposition de mammifères aux ETM, ainsi qu'aux effets induits.

Les ETM sont définis comme des substances non biodégradables, appartenant à la famille des métaux et présentes naturellement en faibles concentrations dans la croûte terrestre. Ces ETM sont considérés comme des polluants lorsqu'ils sont mobilisés et concentrés par les activités humaines dans des matrices qui peuvent causer des dommages environnementaux. Pour la faune sauvage, l'exposition environnementale aux métaux peut induire une multitude de réponses biologiques au niveau populationnel ou communautaire, mais également au niveau individuel, depuis des altérations moléculaires jusqu'à des impacts sur la fitness, via des effets sur la santé des individus. Néanmoins, les études intégratrices permettant des investigations sur les effets de la contamination aux métaux sur les comportements sont rares, ou contradictoires.

De plus, la plasticité comportementale (c'est-à-dire la capacité des individus à ajuster leurs comportements en réponse aux variations de l'environnement), qui fait l'objet d'un grand intérêt en écologie comportementale en raison de son rôle dans la capacité des espèces à faire face aux changements environnementaux rapides, n'est à notre connaissance pas ou très peu abordée dans un contexte de contaminations. En effet, plusieurs études évaluant les effets sublétaux de contaminations d'origines anthropiques effectuées en laboratoire ou dans la nature se sont concentrées principalement sur les réactions comportementales moyennes d'individus ou d'une population contaminée. Or, peu ou pas d'intérêt est porté à l'heure actuelle sur l'étude de cette variabilité individuelle des comportements face à une modification des niveaux de contaminations.

Bénéficiant d'un gradient environnemental de concentration en métaux (Pb, Cd et zinc (Zn)) sur le site d'étude, cette étude vise à comprendre les liens entre niveau de contamination interne (mesurés dans le sang et les organes accumulateurs), effets physiologiques (via le dosage d'hormones de stress notamment) et comportements chez une espèce de micromammifère, le M ulot sylvestre *Apodemus sylvaticus*. Cette étude nécessite la capture, et le maintien temporaire en captivité de 60 individus capturés sur le site d'étude. Les animaux seront maintenus en captivité durant 5 jours, et trois tests

comportementaux (permettant de quantifier trois classes différentes de comportements) seront réalisés au moment de la capture (J0), et après 5 jours de captivité, avant d'être euthanasiés (J5). Dans l'objectif de connaître les concentrations sanguines (et leur évolution en 5 jours) en ETM (Cd, Pb et Zn) des animaux, deux prises de sang seront réalisées, la première à J0 et la seconde à J5. Ces dosages sanguins (donnant des informations sur les niveaux circulants de métaux, généralement considérés comme reflétant l'exposition à court terme) seront complétés par des dosages dans le foie et les reins, organes cibles de ces mêmes métaux. Ces dosages permettront d'estimer l'exposition à plus long terme des animaux. L'obtention de résultats pour le foie et les reins nécessite le prélèvement de ces organes pour dosage, et donc l'euthanasie des individus.

En ce qui concerne les exigences de remplacement, aucune technique *in vitro* ou de modélisation ne permet, à l'heure actuelle et à notre connaissance, de répondre aux objectifs scientifiques du présent projet. Les effectifs souhaités tiennent compte de la règle de la réduction, d'impératifs techniques et d'impératifs statistiques. 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. La faisabilité de remplacer le prélèvement rétro-orbitaire par un prélèvement mandibulaire, a priori moins risquée, sera testée dans le cadre du projet lors d'une première phase de tests (cf procédure expérimentale 1) avant le démarrage de l'expérimentation à proprement dite (procédure expérimentale 2). La phase de test portera sur 15 individus capturés sur le campus de l'Université et permettra de calibrer les mesures comportementales et de tester la faisabilité du prélèvement sanguin mandibulaire.

L'effectif total de Mulots sylvestres nécessaire à cette expérimentation (phase test et expérience proprement dite) sera donc de 77 (15 pour la phase test, 62 pour l'expérience, 60 in fine en prenant en compte un taux plausible de mortalité de 3%).

16921 Notre laboratoire vise à transformer des concepts de physique des ondes, notamment dans le domaine ultrasonore en nouvelles modalités d'imagerie à l'intention des chercheurs d'autres domaines (biologie, oncologie, cardiologie, neurosciences...). Il développe depuis nombreuses années la technologie d'imagerie ultrasonore et nos prototypes de recherche sont en transfert constant vers d'autres institutions : de recherche et hospitalière.

Nous avons une expertise de l'application de l'imagerie ultrasonore au niveau : cérébral, cardiaque, abdominal, visuel et cancérologie. Grâce à ces développements technologiques, de nombreuses collaborations se développent constamment. Ainsi, les technologies développées dans notre laboratoire académique sont exportées vers d'autres laboratoires en France et à l'étranger. De plus, une start-up émergente de notre laboratoire commercialise cette technologie pour l'imagerie chez le rongeur. Tous ces éléments induisent une nécessité de formation de ces futurs collaborateurs/utilisateurs aux approches expérimentales, liées à l'imagerie ultrasonore.

Ce projet a pour but de former les futurs utilisateurs à 3 grands types d'expériences types :

- 1- l'imagerie du cœur chez le rongeur anesthésié
- 2- l'imagerie du cerveau chez le rongeur anesthésié
- 3- l'imagerie du cerveau chez le rongeur éveillé.

Les enseignements pratiqués chez l'animal se feront dans le cadre de formations internes encadrées par les responsables de projet. Les procédures abordées au cours des formations seront avec des degrés de sévérité modérés et sans réveil. Outre l'enseignement en cardiologie qui sera ouverte aux étudiants du Master sans formation particulière, les autres formations seront réservées aux personnes ayant une habilitation à l'expérimentation animale.

La formation sera axée sur les points critiques expérimentaux, permettant l'obtention de résultats reproductibles, comme par exemple :

- L'habituation des animaux : l'animal serait habitué à l'expérimentateur et à l'environnement expérimental pour éviter le stress pendant l'expérience.

- Anesthésie : Acquisition d'une expertise sur son choix (qui dépend des mesures qui seront réalisées), ainsi que du suivi des constantes biologiques qui permettent d'assurer une la stabilisation de la profondeur d'anesthésie, et la reproductibilité des résultats.

Le nombre d'animaux choisi est réduit au minimum (ce nombre est choisi de manière à obtenir un enseignement complet et approprié). L'ensemble des formations nécessitent un total maximal de 345 souris et 320 rats pour les 5 ans.

Ce projet se fera dans le respect de la règle des 3 R, de manière à assurer autant que possible une Réduction des animaux utilisés, dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux pour l'ajout d'enrichissement, l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie pour les chirurgies.

Il nous est impossible de remplacer l'animal car les études des fonctions hémodynamiques cérébrale et cardiaque nécessitent un système biologique intégré.

Ainsi, les points limites permettant l'arrêt des procédures ou d'euthanasier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse seront définis.

16922 La gamétogenèse est centrale à la transmission fidèle du patrimoine génétique aux générations futures. L'infertilité est le plus souvent associée à une gamétogenèse altérée. Chez l'homme, 9% des couples font appel à la Procréation médicalement assistée (PMA) pour les aider à concevoir leur propre enfant. Aujourd'hui, 1-3% de naissances dans les pays occidentaux se font par PMA. Malgré un fort taux de succès, la PMA reste un échec pour près de 50% des couples. D'ailleurs les causes de l'infertilité restent largement inconnues, empêchant, dans la plupart des cas, une évaluation informée des conséquences de la pathologie et des risques pour la descendance.

Notre projet implique la création de 6 lignées murines génétiquement modifiées sur des gènes ayant une expression qui prédomine au cours de la spermatogenèse. Les mutations introduites serviront à étudier la fonction du gène ciblé et, selon le cas, à évaluer l'effet sur la fertilité masculine des variants génétiques identifiés chez des hommes infertiles. Puisque les gènes ciblés sont exprimés surtout dans les testicules, l'effet physique attendu chez les souris transgéniques est un blocage de la spermatogenèse sans douleur pour l'animal. Néanmoins les possibilités de sites d'action hors testicules d'une des protéines ciblées ou de mutations hors cible survenues lors de la modification du génome, ne peuvent pas être exclues. Ce projet porte donc sur l'évaluation phénotypique des nouvelles lignées murines génétiquement modifiées.

Pour réduire le risque de souffrance résultant des effets transgéniques non-prédits, 28 souris porteuses d'une ou deux copies d'un des six transgènes seront suivies par des examens réguliers plusieurs fois par semaine (apparence, comportement, signes cliniques, poids) pour identifier rapidement des signes de détérioration physique et de souffrance. Une souris transgénique montrant un phénotype dommageable associé à une souffrance sera immédiatement euthanasiée. Pour nos études de fertilité, nous avons besoin de souris saines car la souffrance est susceptible de modifier le comportement reproducteur des souris. Au total 168 souris seront observées pour les 6 lignées. Ces souris seront générées par quatre générations de croisements et ainsi notre projet impliquera 1444 souris au total.

Notre projet prend en compte et respecte les 3Rs.

Remplacement: La souris est un bon modèle pour l'étude de la spermatogenèse car les mécanismes impliqués sont très similaires entre la souris et l'homme qui partagent des milliers de gènes exprimés au cours de ce processus biologique. La spermatogenèse est un processus complexe où des cellules qui deviendront des spermatozoïdes se développent en contact étroit avec d'autres cellules nourricières. Il n'existe pas actuellement un système alternatif crédible capable de reproduire la spermatogenèse *ex vivo* ou *in vitro*.

Réduction: En absence d'un phénotype dommageable autre que l'infertilité, les souris suivies pour établir une lignée transgénique seront également utilisées pour étudier les effets du transgène sur la fertilité, but final de la création de ces souris transgéniques.

Raffinement: Les souris seront logées dans les cages avec d'autres souris pour éviter le stress de l'isolement. Le nombre de souris sera limité à cinq par cage moyenne (530 cm²) ou dix par grande cage (1000 cm²). Le sol de la cage est couvert de la sciure adaptée au petit rongeur, et il y a de l'eau

et de la nourriture à volonté. Pour enrichir leur environnement, les cages sont dotées de papier kraft et/ou de refuges en cellulose densifiée. Une souris transgénique montrant un phénotype dommageable associé à une souffrance ne sera pas traitée par analgésie ou anesthésie mais sera immédiatement euthanasiée.

16923 Au cours de la maladie rénale chronique (MRC) s'accumule des déchets appelés toxines urémiques. La modification du microbiote intestinal au cours de la MRC semble être un facteur clé dans la génération de ces toxines. Cependant la relation de causalité entre altération du microbiote et production des toxines urémiques n'a pas été démontré.

Ces déchets sont peu éliminés par la dialyse. Il est donc urgent de trouver des stratégies pour diminuer leur production. La transplantation fécale (FMT) pourrait être une option thérapeutique par la restauration d'un microbiote sain. Si cette étude expérimentale met en évidence un effet positif de la FMT, un essai thérapeutique chez des patients atteints de MRC pourra être envisagé.

Premièrement, dans un modèle de souris ayant une MRC, le bénéfice de la FMT sera évalué. Après un traitement antibiotique oral pour éliminer la flore bactérienne résiduelle, une nouvelle flore intestinale sera implantée par voie orale avec des selles humaines et de souris ayant une MRC ou non, pendant 3 jours de suites toutes les semaines pendant 15 jours.

Deuxièmement, l'effet du microbiote intestinal sera étudié chez des souris saines. Une nouvelle flore intestinale issu de selles humaines et de souris ayant une MRC ou non, sera implantée.

Dans ces deux procédures, l'effet de la transplantation fécale sera étudié sur la production plasmatique des toxines urémiques, la composition du microbiote et les paramètres métaboliques et rénaux.

Remplacer: Les mécanismes impliqués dans production de toxines urémiques sont multifactoriels et ne sont pas modélisables *in vitro*. La MRC et les toxines urémiques ont un effet délétère sur l'ensemble des tissus de l'organisme comme le rein et la régulation du glucose. Il est donc nécessaire de recourir à une étude *in vivo* pour étudier l'impact de la FMT 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.

Réduire: Le nombre d'animaux nécessaires à ces études a été calculé au plus juste afin d'offrir la puissance statistique maximum. Au maximum, 330 animaux seront donc utilisés.

Raffinée: L'induction de la MRC sera réalisée chez la souris par une méthode chirurgicale sous anesthésie générale avec l'utilisation d'analgésiques 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, 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. Les points limites défini en amonts selon le rationel expérimental seront recherchés quotidiennement pour éviter tout souffrance animale.

16924 La sclérose en plaques (SEP) affecte le système nerveux central et est la conséquence d'une attaque incontrôlée par le système immunitaire de la gaine de myéline entourant les fibres nerveuses. Cette gaine qui est essentielle à la propagation du signal nerveux, est alors détruite, entraînant l'apparition de certains symptômes tels que des handicaps moteurs, des troubles de la vue, une faiblesse musculaire ou des engourdissements. Une des étapes clés dans l'apparition de la maladie est le passage des cellules immunitaires du sang vers le système nerveux central (SNC). Ce passage est strictement contrôlé dans les conditions normales et notre projet vise à étudier les mécanismes qui contrôlent la migration des cellules immunitaires dans un modèle expérimental murin de SEP, l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE). Le modèle de l'EAE permet d'étudier la maladie dans un organisme entier ce qui ne peut pas être réalisé 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 la sclérose en plaques.

En conséquence, nous prévoyons l'emploi d'un modèle murin simple que nous maîtrisons parfaitement au laboratoire et un total de 120 souris seront nécessaires pour ce projet qui se déroulera sur 5 ans.

Dans un premier temps, les souris seront anesthésiées pour être immunisées. Elles développeront alors la maladie. Des prélèvements de tissus seront effectués après sacrifices pour analyses histologiques et immunologiques. Chez certaines souris, on injectera par voie intra-péritonéale un anticorps capable de neutraliser un médiateur inflammatoire de la maladie ainsi qu'un modificateur de la perméabilité de la barrière hémato-méningée, ce dernier dans le liquide céphalo-rachidien. Cette chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale et antalgiques. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet. 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. Le stress, la fatigue et la douleur de l'animal sont réduits le plus possible par une surveillance quotidienne, la mise en place de gel alimentaire et l'expérimentation réduite à 25 jours. Nous disposons de tous le matériel nécessaire au confort des animaux durant l'expérimentation et la durée de la chirurgie sera réduite à environ 10 minutes par animal. L'immunisation et la chirurgie seront pratiquées sur des souris anesthésiées et des points limites sont établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire pour éviter toutes souffrances.

A terme cette étude permettra de mieux comprendre les étapes précoces du développement de la SEP.

16925 Chez l'homme comme chez la souris l'administration d'hormones thyroïdiennes augmente la dépense énergétique et entraîne une perte de poids. Malheureusement ces hormones ne peuvent pas être utilisées à cette fin à cause d'effets indésirables en particulier sur le cœur. Elles peuvent agir directement soit dans le cerveau où elles stimulent entre autre le système nerveux sympathique ou directement dans les organes métaboliques comme le tissu adipeux brun. Ce dernier est spécialisé dans la dissipation d'énergie. La consommation d'un régime hypercalorique, riche en gras et en sucre, entraîne une augmentation de la dépense énergétique qui permet de limiter la prise de poids. D'autre part la glycémie est aussi régulée par les hormones thyroïdiennes. De façon surprenante, que ces hormones soient en quantité anormalement basse (hypothyroïdie) ou en excès (hyperthyroïdie), les quantités circulantes de glucose sont plus importantes que chez des individus euthyroïdiens. Cela reflète certainement, des effets de l'hypothyroïdie et de l'hyperthyroïdie sur des organes différents, les organes et mécanismes impliqués restent pour l'heure non élucidés. Notre étude vise à déterminer comment les hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs TR augmentent la dépense énergétique, régulent la glycémie et de ce fait modulent la progression de l'obésité et des maladies métaboliques associées. Nous voulons en particulier déterminer quelles sont les cellules cibles des effets métaboliques des hormones thyroïdiennes et quels sont les gènes cibles directs dans les cellules d'intérêt.

Pour cela nous utilisons des souris génétiquement modifiées pour invalider la signalisation de l'hormone thyroïdienne, sélectivement dans les deux types cellulaires d'intérêt : les tanocytes qui sont les seules cellules du cerveau qui produisent des hormones thyroïdiennes et les adipocytes bruns.

Pour ce faire deux procédures seront utilisées, la première permettra de déterminer quels sont les tissus responsables des effets métaboliques associés à des variations du statut thyroïdien. Trois statuts seront obtenus : hypothyroïdie (par un régime pauvre en iode), euthyroïdie (groupe contrôle sans traitement) et hyperthyroïdie (hypothyroïdie puis injection d'hormones thyroïdiennes). On suivra chez ces animaux, la prise alimentaire, la prise pondérale, et la capacité à disposer du glucose, mais aussi la prolifération cellulaire dans les tissus métaboliques toutes fonctions régulées par les hormones thyroïdiennes. La seconde permettra de déterminer les gènes cibles directes, et donc les voies de signalisations contrôler par les hormones thyroïdiennes dans les deux cellules d'intérêt : les tanocytes et les adipocytes bruns.

Le maintien de la balance énergétique fait intervenir de nombreux organes qui dialoguent entre eux, ne permettant pas de s'affranchir du modèle vivant. Un suivi adapté à chaque procédure a été mis en place et des points limites fixés pour limiter la souffrance des animaux et au-delà desquels les animaux sont retirés de la procédure. Au sein d'une même procédure une période de récupération est prévue entre les différentes interventions pour limiter la souffrance des animaux. Le maintien en groupes sociaux et l'utilisation d'anesthésiques permettent aussi d'amoinrir la souffrance ou le mal être des

souris. Le nombre minimal d'individus nécessaires a été calculé au plus juste pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 1056 souris.

Ce projet permettra de trouver dans quel tissu et par quels mécanismes les hormones thyroïdiennes affectent la balance énergétique. L'idée étant qu'avec les progrès de la pharmacologie de nouvelles molécules qui ne stimulent que les activités métaboliquement bénéfiques des hormones thyroïdiennes, pourraient être générées.

16926 Ce projet a pour objectif de déterminer la tolérance, la biodisponibilité et le profil pharmacocinétique d'un produit vétérinaire chez le chien.

Pour le développement d'un produit, les différentes voies d'administration (orale, intraveineuse, application locale, sous cutanée...) et/ou formulations candidates doivent être comparées entre elles afin de déterminer celle qui est la plus adaptée pour le traitement de l'animal. Lorsque la voie d'administration topique (sur la peau) est choisie, il peut être en plus nécessaire de vérifier les effets d'une exposition chez l'homme (par contact avec son animal de compagnie). Les données pharmacocinétiques suite à une administration orale ou topique chez le chien peuvent aussi être utiles pour répondre à cet objectif.

Chaque test sera réalisé comme suit : pour chaque formulation, 3 à 12 chiens seront traités à la posologie recommandée par le fabricant et les volumes administrés ne dépasseront pas les recommandations du Gircor. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque chien pourra recevoir séquentiellement chacune des formulations. Entre chaque test, des périodes de repos suffisantes seront respectées. La voie intraveineuse servira de référence en terme de biodisponibilité du produit pour les autres voies.

La pharmacocinétique reposera sur des prélèvements sanguins, et/ou tout autre prélèvement permettant une analyse de la biodisponibilité du traitement tel que des prélèvements cutanés, la récolte de fèces, des prélèvements de salive, d'urine... La fréquence et le volume des prélèvements seront déterminés en fonction du respect du bien-être et de la santé des animaux, et respecteront les recommandations du Gircor.

Pour garantir la qualité des résultats, les animaux pourront être hébergés individuellement afin d'éviter qu'ils ne se lèchent entre eux après l'application d'un traitement topique et éventuellement porter une collerette. Dans tous les cas ce temps sera réduit au minimum et les animaux resteront en contact visuel, olfactif et sonore avec leurs congénères. Tout sera mis en œuvre pour limiter le stress qui pourrait être induit sur les animaux avec entre autre, une amplification des actions de socialisation (caresses, jouets, plateformes...)

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 90 chiens. La procédure expérimentale pourra être réalisée en cross-over, pour permettre de répondre aux objectifs de l'étude en réduisant le nombre d'animaux utilisés.

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

16927 Lorsque l'on contracte une infection, l'organisme se défend en produisant de l'inflammation. Dans les formes les moins sévères d'infection, cela explique la fièvre, la fatigue et la plupart des symptômes que le patient ressent. Cette réponse inflammatoire de l'organisme s'appelle le sepsis. Le sepsis va finir par "agresser" les organes de la personne infectée, générant en grande partie la gravité de l'infection. Les formes les plus sévères de sepsis vont engendrer une ou plusieurs dysfonctions d'organe. Parmi les dysfonctions d'organes liées au sepsis, une des plus grave est l'atteinte du cœur. Elle peut se traduire la survenue de troubles du rythme cardiaque dont le plus fréquent est la fibrillation auriculaire (FA).

Les mécanismes impliqués dans la survenue de la FA liée au sepsis doivent encore être explorés. Il est connu que ces mécanismes reposent sur les molécules de l'inflammation et les mouvements d'ions (comme le calcium ou le potassium) dans les cellules cardiaques. Des études chez l'animal ont déjà montré qu'une action thérapeutique sur des canaux ioniques nommés IKACH, laissant passer des ions potassium, pouvait protéger le cœur de la survenue de FA. Ces résultats n'ont pas été confirmés chez

l'homme mais il est probable que certains types de FA (par exemple celle liée au sepsis) soit plus accessible à cette thérapeutique.

L'objectif de ce travail est de montrer l'implication de ces protéines dans la FA liée au sepsis et que le blocage des IKACH pourrait avoir une action protectrice en cas d'infection sévère. Pour étudier cette nouvelle voie thérapeutique, un modèle s'approchant au plus près des patients de réanimation est nécessaire. Nous allons donc utiliser un modèle de souris sous anesthésie générale, infectée par une injection d'un fragment de bactérie (LPS d'*Escherichia coli*) et allons étudier la fonction électrique du cœur par stimulation et enregistrement électrophysiologique par voie trans-œsophagienne. Cette technique de provocation électrique, dérivée de méthode diagnostique utilisée chez l'Homme, est non invasive et ne nécessite aucune chirurgie.

En parallèle, nous réaliserons le dosage des molécules de l'inflammation et nous étudierons les courants potassiques dans les cellules cardiaques.

Notre étude sera menée sur des souris de 8 semaines, selon les recommandations institutionnelles en vigueur. Un total de 72 animaux sera utilisé sur 5 ans pour ce projet. Un groupe de 48 souris recevra une dose de LPS de 20 mg/kg. Le reste des animaux sera utilisé comme témoin.

Le bien-être animal et le respect du principe des 3 R sera une préoccupation majeure dans ce protocole depuis l'accueil des animaux, leurs hébergement et manipulation. Les animaux seront hébergés en portoir ventilé, dans le respect de la réglementation concernant les effectifs par cage, et des lanières de résineux tendres seront utilisés pour l'enrichissement. Des points limites sont établis afin d'éviter ou limiter toute souffrance des animaux. Pour ce faire, 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. Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée aux animaux. Les mesures électrophysiologiques, non douloureuses, seront de plus réalisées sous anesthésie générale. 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 d'un maximum de données pour chaque animal (fréquence cardiaque, analyse biologique, histologie) afin d'apparier les mesures, de diminuer les groupes et d'optimiser les interprétations. Nous utiliserons de façon optimale les tissus des animaux sacrifiés (multiplication des analyses, travail sur des échantillons de petite taille).

16928 Le cancer de l'ovaire est la septième cause de cancer chez la femme : le nombre de nouveaux cas de cancers de l'ovaire en 2011 est estimé à 4617 cas, soit 7,9 pour 100 000 personnes. Le taux de mortalité est de 4,8 cas pour 100 000 : c'est la quatrième cause de décès par cancer chez la femme. Les tumeurs de l'ovaire les plus fréquentes (80 à 90%) sont les tumeurs épithéliales, ou adénocarcinomes. Leur diagnostic est souvent tardif, ce qui explique leur pronostic défavorable. L'idée est d'utiliser l'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) couplée à des agents de contraste pour une détection plus sensible de l'adénocarcinome ovarien.

La plupart du temps, l'IRM se suffit à elle-même mais, dans environ 30% des cas, le contraste naturel entre les différents tissus à analyser n'est pas suffisant et nécessite l'injection d'un agent de contraste. Ils permettent d'augmenter le contraste et la spécificité de la technique. Actuellement plus de 30% des examens IRM sont réalisés avec une injection d'agents de contraste. Injectés le plus souvent par voie intraveineuse (I.V), ils modifient les propriétés magnétiques des tissus où ils se fixent ; ce qui modifie l'intensité du signal sur les images.

Les agents de contraste que nous proposons d'utiliser cibleront les récepteurs aux folates (acide folique ou vitamine B9) largement surexprimés dans les cancers des ovaires (dans 80% des cas), impliqués dans la prolifération tumorale et signe de malignité. Ce sont donc des cibles diagnostiques et thérapeutiques de choix dans le cancer de l'ovaire.

Nous utiliserons des nanoparticules lipidiques à base de gadolinium (utilisé en routine clinique) permettant d'augmenter l'intensité de l'image là où elles se fixent. Aucun dommage n'est donc attendu sur la souris.

Notre étude sera réalisée sur des souris porteuses de tumeurs ovariennes xénotreffées ou de tumeurs obtenues par injection de cellules tumorales directement dans l'ovaire. L'IRM étant totalement non

invasive et atraumatique, les dommages attendus sont uniquement liés au développement tumoral. Une évaluation quotidienne visuelle des animaux sera réalisée en s'appuyant sur des grilles de scoring pour anticiper la douleur chez les animaux.

Les souris seront anesthésiées pendant la procédure d'imagerie. Des images seront réalisées avant et après l'injection d'agent de contraste par voie intraveineuse. La durée du protocole d'imagerie est de 1 heure maximum.

L'objectif de ce projet est double (1) identifier le stade tumoral où la tumeur sera la plus vascularisée (afin d'optimiser le passage de l'agent de contraste dans la tumeur) (2) évaluer l'efficacité de nos agents de contraste (5 agents seront testés) en quantifiant l'augmentation de l'intensité de la prise de contraste sur les images de la tumeur. Ce projet nécessitera 540 souris NOD/SCID nude 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 sera 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.

16929 Ces travaux pratiques ont pour but d'apprendre aux étudiants à manipuler correctement les souris ainsi que les différentes voies d'administration.

Dans ce cadre, les étudiants apprennent à acquérir les bons gestes de préhension, de contention et d'injection en présence d'un enseignant expérimenté et formé.

Ces travaux pratiques sont basés sur l'utilisation de souris femelles adultes (525 sur 5 ans). Nous respecterons la règle des 3R : nous avons organisé les séances de façon à ce que le nombre d'animaux soit réduit (une souris par étudiant) et que chaque lot de souris soit utilisé en rotation afin de limiter leur manipulation. Les animaux sont élevés en présence d'enrichissement et regroupés afin de favoriser les interactions sociales. Une observation quotidienne sera effectuée afin d'éviter au maximum tout souffrance physique et psychologique.

16930 Tout expérimentateur amené à travailler sur l'animal de laboratoire a besoin d'acquérir, d'entretenir ou de perfectionner ses compétences techniques. Ce projet est dédié à l'entraînement du personnel sur les gestes nécessaires à la bonne réalisation des procédures expérimentales des projets. Ces gestes sont acquis à l'occasion de formations, animées par des formateurs internes à l'entreprise (transmission des compétences, tutorat, atelier nouveaux arrivants) ou externes (formation réglementaire en chirurgie, nouvelles techniques...). Ce projet s'inscrit dans l'obligation réglementaire décrite dans l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques.

Il contribue, par la mise en place de formations pratiques au sein de l'établissement, à la compétence du personnel.

L'utilisation d'un animal vivant est nécessaire pour un bon apprentissage et pour être au plus près des conditions expérimentales réelles des projets de recherche réalisés au sein de notre centre de recherche.

Un entraînement régulier et une compétence adéquate du personnel contribuent à une réalisation efficace des études, augmentant la fiabilité des résultats, tout en respectant au mieux le bien-être animal par la pratique de gestes maîtrisés.

Le type de gestes étudiés est choisi et adapté en fonction des besoins d'apprentissage et/ou de perfectionnement pour des études spécifiques. Les espèces animales utilisées pour chaque formation

sont ciblées et en adéquation avec les activités réelles de chaque expérimentateur. Ce projet décrit ainsi les conditions d'entraînement et de formation sur les espèces souris et rat.

Le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition du ou des gestes par opérateur sera évalué en fonction du besoin d'apprentissage et réduit au strict minimum. A cette fin, la réutilisation d'animaux issus d'un premier projet et n'ayant que peu ou pas ressenti de stress ou de douleur est privilégiée, (témoins des études par exemple) dans la stricte condition de leur bon état général évalué par notre vétérinaire référent et conformément à la réglementation. Les animaux pourront également dans certaines conditions être utilisés sur plusieurs sessions de formation, en fonction du type de geste et toujours dans la mesure de leur bon état de santé.

Les techniques d'administrations par les principales voies ou d'autres gestes simples et non invasifs pourront être réalisées chez l'animal vigile.

La plupart des gestes de prélèvements sanguins ainsi que les gestes pouvant générer un stress ou un inconfort pour l'animal seront réalisés sous anesthésie et analgésie dès que nécessaire.

Chaque espèce bénéficie de conditions d'hébergement enrichies spécifiquement, favorables à l'expression de leurs instincts (nidification, jeu, ...) et adaptées à leurs besoins. Ils font l'objet d'une surveillance particulière au cours des sessions d'entraînement et lors des phases de maintien entre chaque session. Une attention particulière sera portée également à la fréquence et aux volumes de prélèvements ainsi qu'aux temps de récupération recommandés. Des points limites prédéfinis seront mis en application en cas d'altération de leur état général.

On peut estimer à environ 300 souris et 300 rats le nombre d'animaux nécessaire pour toute la durée du projet, soit 5 ans, dans le cadre de la formation du personnel (12 à 30 stagiaires par an).

16931 Chez l'homme comme chez la souris l'administration d'hormones thyroïdiennes augmente la dépense énergétique et entraîne une perte de poids. Malheureusement ces hormones ne peuvent pas être utilisées à cette fin à cause d'effets indésirables en particulier sur le cœur. Elles peuvent agir directement soit dans le cerveau où elles stimulent le système nerveux sympathique ou directement dans les organes métaboliques comme le tissu adipeux brun. Ce dernier est spécialisé dans la dissipation d'énergie. La consommation d'un régime hypercalorique, riche en gras et en sucre, entraîne une augmentation de la dépense énergétique qui permet de limiter la prise de poids. Notre étude vise à déterminer comment les hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs TR augmentent la dépense énergétique et de ce fait module la progression de l'obésité en réponse à un régime hypercalorique.

Pour cela nous utilisons des souris génétiquement modifiées pour invalider la signalisation de l'hormone thyroïdienne, sélectivement dans les deux types cellulaires d'intérêt : les tanocytes qui sont les seules cellules du cerveau qui produisent l'hormone thyroïdienne et les adipocytes bruns. Les objectifs sont de déterminer d'une part quelles sont les cibles cellulaires des hormones thyroïdiennes où elles stimulent la dépense énergétique en réponse à un régime hypercalorique, d'autre part les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation. Pour ce faire nous nourrirons en parallèle les animaux génétiquement modifiés avec un régime contrôle ou hypercalorique afin de mesurer l'impact de la signalisation thyroïdienne sur la sensibilité à l'obésité et aux désordres métaboliques associés comme la résistance à l'insuline. Une alimentation avec le régime hypercalorique pendant plusieurs mois sera réalisée pour mesurer les paramètres physiologiques, une alimentation avec ce même régime sur trois jours seulement permettra elle d'étudier les mécanismes impliqués avant que des mécanismes compensatoires aient pu se mettre en place.

Aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle murin pour ce type d'études physiologiques qui impliquent la communication entre différents organes. Les mécanismes sont complexes et doivent être envisagés à l'échelle de l'organisme entier.

Un suivi adapté à chaque procédure a été mis en place et des points limites suffisamment prédictifs ont été fixés pour éviter toute souffrance des animaux et au-delà desquels la procédure est arrêtée. Au sein d'une même procédure une période de récupération est prévue entre les différentes interventions pour limiter la souffrance des animaux. Le maintien en groupes sociaux et l'utilisation d'anesthésiques permettent aussi d'éviter le stress et de limiter tout risque de souffrance. Le nombre minimal d'individus

nécessaires a été calculé au plus juste pour permettre l'obtention de résultats statistiquement significatifs. L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 896 souris.

Ce projet permettra donc de déterminer dans quel tissu et par quels mécanismes les hormones thyroïdiennes affectent la balance énergétique. L'idée étant qu'avec les progrès de la pharmacologie de nouvelles molécules qui ne stimulent que les activités métaboliquement bénéfiques des hormones thyroïdiennes, pourraient être générées.

16932 Chez l'homme comme chez la souris l'administration d'hormones thyroïdiennes augmente la dépense d'énergie. Il existe un lien direct entre ces hormones et la température corporelle. Lorsque leurs concentrations sont faibles (situation d'hypothyroïdie), la sensibilité au froid est accrue, au contraire lorsque leurs concentrations sont fortes (situation d'hyperthyroïdie), il existe une hypersensibilité à la chaleur. Les hormones thyroïdiennes peuvent agir soit dans le cerveau où elles stimulent le système nerveux sympathique qui utilise la voie nerveuse pour stimuler les organes métaboliques soit directement dans ces organes métaboliques comme le tissu adipeux brun. Ce dernier est spécialisé dans la dissipation d'énergie et la production de chaleur. Lors d'une exposition au froid, le tissu adipeux brun produit de l'hormone thyroïdienne, localement, ce qui permet le maintien de la température corporelle. Les individus hypothyroïdiens ont des difficultés à maintenir leur température corporelle lorsqu'ils sont exposés au froid. Notre étude vise à comprendre comment les hormones thyroïdiennes régulent la dépense d'énergie en réponse au froid.

Pour cela nous utilisons des souris génétiquement modifiées pour invalider la signalisation des hormones thyroïdiennes, sélectivement dans les deux types cellulaires d'intérêt : les tanocytes qui sont les seules cellules du cerveau qui produisent des hormones thyroïdiennes et les adipocytes bruns. Les objectifs sont de déterminer d'une part quelles sont les cibles cellulaires des hormones thyroïdiennes dans lesquelles elles stimulent la dépense énergétique en réponse au froid, d'autre part les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation. Nous étudierons si les mutations impactent la température corporelle à thermoneutralité (30°C), qui représente la température à laquelle aucune activité spécifique n'est nécessaire pour maintenir la température corporelle, et en réponse au froid. Deux procédures sont utilisées: une exposition longue de 3 jours au froid en présence de nourriture qui mime une réponse physiologique et permet d'étudier les phénomènes d'acclimatation, mais aussi une exposition plus courte en absence de nourriture, puisqu'une fonction pressentie des hormones thyroïdiennes est de permettre une synthèse locale de lipides qui est moins nécessaire en présence de nourriture.

Aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle murin pour ce type d'études physiologiques qui impliquent la communication entre différents organes. Les mécanismes sont complexes et doivent être envisagés à l'échelle de l'organisme entier.

Un suivi adapté à chaque procédure a été mis en place et des points limites suffisamment prédictifs ont été fixés pour éviter toute souffrance des animaux et au-delà desquels la procédure est arrêtée. Au sein d'une même procédure une période de récupération est prévue entre les différentes interventions pour limiter la souffrance des animaux. Le maintien en groupes sociaux et l'utilisation d'anesthésiques permettent aussi d'éviter le stress et de limiter tout risque de souffrance. Le nombre minimal d'individus nécessaires a été calculé au plus juste pour permettre l'obtention de résultats statistiquement significatifs

L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 640 souris.

Ce projet permettra de déterminer dans quel tissu et par quels mécanismes les hormones thyroïdiennes affectent la balance énergétique pour permettre une acclimatation au froid.

16933 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité et constituent donc un enjeu majeur de santé publique. En France, entre 500000 et 1 million de personnes souffrent d'insuffisance cardiaque, pour un coût estimé à 1 milliard d'euros. Dans ce contexte, de nombreuses études ont montré que les modèles murins de remodelage cardiaque induit par surcharge de pression ventriculaire ou par traitement pharmacologique sont des modèles d'étude qui reproduisent les atteintes cardiaques observées chez l'Homme. A ce jour, seul l'animal vivant peut permettre d'évaluer ces

paramètres et il n'existe pas à l'heure actuelle de moyens alternatifs. Dans ces modèles, on observe suite au traitement un épaississement des parois cardiaques et le développement d'une fibrose myocardique, qui peuvent conduire à l'insuffisance cardiaque chronique. A l'heure actuelle, la sédentarité grandissante et le vieillissement des populations occidentales font de l'obésité et du vieillissement les deux facteurs de risque les plus prévalents dans le déclenchement et la progression de l'insuffisance cardiaque. Dans ce contexte, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus adaptatifs ou maladaptatifs est nécessaire. Les expériences visent à déterminer l'efficacité protectrice d'une molécule dans l'insuffisance cardiaque dans un contexte de vieillissement ou d'obésité. Les bonnes pratiques seront observées tout au long de l'étude, notamment un suivi journalier approprié, par un zootechnicien qualifié, de l'animal hébergé dans une zootechnie agréée et l'adoption de points limites définis par la combinaison des critères comportementaux, physiologiques, des signes cliniques et zootechniques observés (perte de poids de plus de 20% du poids d'origine, poils hérissés, absence de toilettage, prostration, dos rond, abdomen distendu, dacryorrhée). Le franchissement de points limites entraînera le sacrifice de l'animal. La comparaison statistique de deux groupes se fera par un test T non apparié (dans le cas où les résultats suivent la loi normale). Dans le cas contraire, un test non paramétrique sera utilisé (Mann-Whitney). Pour comparer plusieurs groupes, une ANOVA à une voie suivie d'un test post-hoc de Bonferroni sera réalisée.

Dans son ensemble, ce projet, qui comprendra 260 souris, nous permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de l'insuffisance cardiaque en lien avec l'obésité et le vieillissement et ainsi de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes afin d'améliorer le traitement et la prise en charge des patients.

16934 Le vieillissement cellulaire (ou sénescence cellulaire) est un mécanisme clé dans la physiopathologie des maladies liées à l'âge, en particulier la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), maladie très fréquente, 3 millions de patients en France, caractérisée par une inflammation chronique des bronches et un emphysème qui est une destruction des alvéoles pulmonaires. Dans la BPCO, les cellules sénescents bloquent la capacité de réparation du poumon et libèrent de nombreux facteurs toxiques appelés « secrétome associé à la sénescence » ou SASP. Limiter la sénescence cellulaire et le SASP représente un objectif thérapeutique majeur dans la BPCO, actuellement dépourvue de traitement curatif. Ce projet fait suite à l'identification du récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1) comme acteur clé de la sénescence, mais dont le rôle en pathologie est inconnu. Un aspect intéressant au plan thérapeutique est que PLA2R1 active une voie de signalisation (la voie JAK2) qu'on peut inhiber pharmacologiquement grâce à des médicaments comme le ruxolitinib, qui sont donnés en clinique dans d'autres indications avec une très bonne tolérance. Le travail déjà réalisé a été conduit en partie sur des poumons et cellules de patients BPCO et témoins opérés pour chirurgie d'exérèse qui consiste à retirer le tissu nuisible de l'organisme du patient.

Nous montrons que PLA2R1 joue un rôle majeur dans la sénescence cellulaire liée à la BPCO, et que le ruxolitinib s'oppose à la sénescence liée à la BPCO. Nous montrons que des souris surexprimant PLA2R1 développent un emphysème que l'on peut inhiber par le ruxolitinib administré en préventif.

Au vu des résultats préliminaires obtenus, l'hypothèse est que l'inhibition pharmacologique de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib pourrait représenter une stratégie thérapeutique pour limiter les altérations pulmonaires, de façon indépendante à l'activation du récepteur PLA2R1.

L'objectif ici est d'évaluer l'efficacité d'un traitement chronique par le ruxolitinib, inhibiteur de JAK1/JAK2, dans deux modèles murins d'emphysème pulmonaire, en comparaison avec la délétion génétique de PLA2R1. Le but est de valider l'inhibition de JAK1/JAK2, indépendamment de PLA2R1, en tant que stratégie thérapeutique en pathologie humaine.

Deux types de souris seront utilisés : des souris génétiquement modifiées les PLA2R1KO qui n'exprime pas le gène PLA2R1 et les WT littermatte pour contrôle. Les souris PLA2R1 KO sont délétées pour le gène PLA2R1 et permettent donc d'étudier l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT de façon indépendante de la voie PLA2R1. Dans notre étude, l'utilisation de la souris est indispensable car il s'agit d'une pathologie complexe faisant intervenir plusieurs types de cellules à la fois. Elle ne peut donc pas être conduite sur des cellules en culture. En réduisant au minimum le nombre de souris tout

en garantissant l'obtention de résultats robustes scientifiquement et statistiquement, nous utiliserons 304 souris.

Les techniques utilisées et le mode d'hébergement des souris ont été raffinés afin de maintenir le bien-être des souris tout au long de l'étude.

16935 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) 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 curative sur le marché pour la DMD. Cependant, il a été démontré que si l'on administre un traitement à base de corticostéroïdes, très tôt chez les jeunes patients, ils en tirent un profit en terme de prolongement de leur capacité ambulatoire et de retard de l'apparition des signes d'insuffisance respiratoire. De fait, la grande majorité des patients atteints de DMD sont sous corticothérapie de longue durée et ce même s'ils participent à des essais cliniques. A ce jour les modèles *in vitro* ne permettent de valider que les premières étapes de l'élaboration de nouveaux médicaments et il faut ensuite envisager un passage sur les modèles animaux. De plus le modèle souris couramment employé (souris mdx) n'est pas satisfaisant car il ne reproduit pas fidèlement l'ensemble de la symptomatologie de la maladie humaine contrairement au chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), qui reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques et fonctionnelles rencontrées chez les patients mais qui nécessite des infrastructures particulières coûteuses et un suivi vétérinaire lourd contraignant.

Pour pallier au manque de modèle fidèle à la maladie et de taille moyenne, nous avons récemment développé un modèle de rat myopathe qui semble mimer fidèlement la symptomatologie des patients DMD et représente donc un modèle de taille raisonnable à développement rapide permettant la validation préclinique de traitements.

La tendance actuelle étant à la généralisation de l'usage des corticostéroïdes chez les patients DMD, les modèles précliniques pour répondre au plus près aux questions de niveaux d'efficacité attendus des différentes approches thérapeutiques testées (thérapie génique, cellulaire, pharmacologique) doivent être placés dans les mêmes conditions. Actuellement le traitement aux corticostéroïdes est quotidien et est plus ou moins bien toléré sur le long terme, cependant il est envisagé de revoir les protocoles et notamment de moduler la fréquence d'administration. Cette étude a donc pour objectif de décrire de manière quantifiée et exhaustive l'effet d'un traitement à base de Methylprednisolone, administrée en intramusculaire de façon hebdomadaire (0.75mg/kg/semaine) et sur le long cours chez les rats DMD soit précocement (3 semaines) lorsque les sujets sont encore asymptomatiques soit plus tardivement lorsque la maladie est déjà établie (5 mois) pour voir s'il est possible de freiner le développement de la maladie. Cette étude utilisera un total de 156 rats, qui seront traités de l'âge de 3 semaines jusqu'à l'âge de 3, 6 ou 9 mois ou de l'âge de 5 mois jusqu'à l'âge de 6, 9 ou 12 mois et comparés à des rats DMD non traités et à des rats sains traités ou non traités, suivis de la même manière et sur la même période. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum en tenant compte de la variabilité observée dans une population de rats DMD tout en ayant suffisamment de matériel pour réaliser toutes les analyses biologiques nécessaire à l'évaluation de la maladie. Pour limiter le stress, les rats seront évalués à l'aide de nombreuses mesures non invasives dérivées de méthodes utilisées chez les patients et adaptées aux rats. Les rats seront habitués aux manipulations dès leur plus jeune âge et seront hébergés par 2-3 individus selon l'âge dans des cages contenant des enrichissements correspondant à leur espèce. Ils seront observés quotidiennement 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. Un effet bénéfique est attendu sur l'ensemble des paramètres évalués et cette étude permettra de déterminer précisément le niveau de cet effet, constituant ainsi une base de comparaison avec d'autres thérapies et pour nos prochaines études précliniques, qui comme c'est le cas chez les patients comprendront des rats DMD dont la maladie sera atténuée par le traitement aux corticostéroïdes.

16936 Le vieillissement cellulaire (ou sénescence cellulaire) est un mécanisme clé dans la physiopathologie des maladies liées à l'âge, en particulier la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO),

maladie très fréquente, 3 millions de patients en France, caractérisée par une inflammation chronique des bronches et un emphysème qui est une destruction des alvéoles pulmonaires. Dans la BPCO, les cellules sénescentes bloquent la capacité de réparation du poumon et libèrent de nombreux facteurs toxiques appelés « secrétome associé à la sénescence » ou SASP. Limiter la sénescence cellulaire et le SASP représente un objectif thérapeutique majeur dans la BPCO, actuellement dépourvue de traitement curatif. Ce projet fait suite à l'identification du récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1) comme acteur clé de la sénescence, mais dont le rôle en pathologie est inconnu. Un aspect intéressant au plan thérapeutique est que PLA2R1 active une voie de signalisation (la voie JAK2) qu'on peut inhiber pharmacologiquement grâce à des médicaments comme le ruxolitinib, qui sont donnés en clinique dans d'autres indications avec une très bonne tolérance. Le travail déjà réalisé a été conduit en partie sur des poumons et cellules de patients BPCO et témoins opérés pour chirurgie d'exérèse qui consiste à retirer le tissu nuisible de l'organisme du patient. Nous montrons que PLA2R1 joue un rôle majeur dans la sénescence cellulaire liée à la BPCO, et que le ruxolitinib s'oppose à la sénescence liée à la BPCO. Nous montrons que des souris surexprimant PLA2R1 développent un emphysème que l'on peut inhiber par le ruxolitinib administré en préventif.

Au vu des résultats préliminaires obtenus, l'hypothèse est que l'inhibition pharmacologique de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib pourrait représenter une stratégie thérapeutique pour limiter les altérations pulmonaires, de façon indépendante à l'activation du récepteur PLA2R1.

L'objectif ici est d'évaluer l'efficacité d'un traitement chronique par le ruxolitinib, inhibiteur de JAK1/JAK2, dans deux modèles murins d'emphysème pulmonaire, en comparaison avec la délétion génétique de PLA2R1. Le but est de valider l'inhibition de JAK1/JAK2, indépendamment de PLA2R1, en tant que stratégie thérapeutique en pathologie humaine.

Deux types de souris seront utilisés : des souris non transgéniques, et des souris génétiquement modifiées nommées p16-luc. Chez les souris p16-luc, les cellules sénescentes sont bioluminescentes, ce qui permet de les observer et de les quantifier par imagerie chez des souris vivantes. Dans notre étude, l'utilisation de la souris est indispensable car il s'agit d'une pathologie complexe faisant intervenir plusieurs types de cellules à la fois. Elle ne peut donc pas être conduite sur des cellules en culture. En réduisant au minimum le nombre de souris tout en garantissant l'obtention de résultats robustes scientifiquement et statistiquement, nous utiliserons 232 souris.

Les techniques utilisées et le mode d'hébergement des souris ont été raffinés afin de maintenir le bien-être des souris tout au long de l'étude.

16937 Les synapses du système nerveux central, organisées en réseaux, assurent la transmission des informations dans le cerveau. Les protéines dites « d'échafaudage » sont essentielles au maintien de la stabilité structurelle et de l'excitabilité des synapses. En particulier, la protéine Shank3 joue un rôle clef dans la stabilité synaptique, puisqu'elle permet de maintenir un grand nombre de protéines au niveau de la post-synapse au sein d'un complexe fonctionnel. Il a été montré que des mutations de Shank3 chez l'Homme sont associées à des formes d'autisme. Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) représentent 2% de la population infantile et sont caractérisés entre autres par des déficits cognitifs et des stéréotypies. Au laboratoire, nous disposons d'une lignée de souris modèles d'autisme présentant une mutation de la protéine Shank3 : Shank3DC. Cette mutation invalide sa fonction, et les souris présentent des déficits comportementaux et des altérations de l'activité neuronale, déficits réminiscents de la représentation clinique de la maladie. Nous avons mis au point une stratégie permettant de rétablir le complexe fonctionnel, malgré la mutation de Shank3, via l'expression d'une protéine chimérique. Nous avons pu montrer *in vitro* son effet bénéfique sur la localisation, l'activation des récepteurs et les voies de signalisation intracellulaire. Nous voulons maintenant étudier si l'expression de cette protéine chimérique peut rétablir une activité neuronale classique et les déficits comportementaux observés chez la souris Shank3DC.

Cette étude nécessite l'utilisation de modèles animaux car elle adresse des mécanismes physiopathologiques complexes qui ne peuvent pas être récapitulés par des modèles plus simples (ex. culture de neurones). Nous avons appliqué la règle des 3R. Remplacer : nous avons obtenu le maximum d'informations préliminaires sur l'efficacité de la protéine chimérique par expérimentation *in vitro* (culture cellulaire). Réduire : nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche

rationnelle et au double emploi de certains animaux lorsque possible. Plusieurs informations seront obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal i) plusieurs comportements seront testés en série sur les mêmes groupes d'animaux ii) ces animaux seront utilisés pour des analyses histologiques post-mortem. Raffiner : nous vérifierons aussi que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales qui garantissent le bien-être des animaux utilisés. Ainsi les animaux seront maintenus sous anesthésies générale pendant la procédure expérimentale nécessitant une approche chirurgicale et seront suivis quotidiennement en post-opératoire pour évaluation des signes de douleur. Des analgésiques seront administrés en cas de douleurs non sévère (activité réduite, fourrure ébouriffée) à persistante (activité réduite, fourrure ébouriffée, dos rond, aversion des congénères). Nous serons aussi attentifs aux signes d'infections, qui seront traités par antibiotique le cas échéant. Nous estimons à 63 le nombre total de souris utilisées sur 1 an.

16938 Le développement d'additifs alimentaires (comprenant de manière non exclusive vitamines et métabolites, enzymes, immunostimulants, probiotiques, prébiotiques, modulateurs métaboliques du microbiome, acides organiques et huiles essentielles) a pour objectif l'amélioration de la nutrition et de la santé animale. Les enzymes ont pour but d'améliorer la valeur nutritive des ingrédients utilisés dans les aliments pour animaux d'élevage, ou d'améliorer celle d'un nouvel ingrédient. Les vitamines sont ajoutées à l'aliment sous forme de prémélanges et sont indispensables à la croissance des animaux d'élevage. Les immunostimulants, probiotiques et prébiotiques permettent d'améliorer le bien-être des animaux d'élevage tout en réduisant les effets de stress potentiels, en améliorant leurs défenses immunitaires et en stabilisant le microbiote intestinal. Les acides organiques, les huiles essentielles ou des combinaisons de ces produits sont développés comme alternatives à l'utilisation des antibiotiques, afin d'améliorer la santé gastro-intestinale des animaux, ainsi que leur performance.

Le présent projet a pour objectifs principaux :

- de contribuer à la découverte de nouveaux additifs alimentaires.
- de réaliser des études d'efficacité et de tolérance pour l'enregistrement de ces additifs.
- de rechercher de nouvelles applications pour les additifs déjà enregistrés.
- de comparer l'efficacité des additifs développés par notre établissement avec ceux du marché.

Le développement d'additifs alimentaires passe nécessairement par une étape d'enregistrement des dits additifs auprès des autorités compétentes. A ces effets, certains types d'études doivent donc être menés, selon des modalités propres à chaque organisme d'autorisation, par exemple l'EFSA en Europe ou CVM/FDA aux Etats-Unis d'Amérique. Malgré des différences notoires dans les attentes des différents organes de régulation, il est possible de séparer les essais en deux grandes catégories, des essais d'efficacité, visant à démontrer l'utilité d'un produit, d'une part, et les essais de tolérance visant à démontrer son innocuité aux doses recommandées d'autre part.

Des études de tolérance peuvent être réalisées afin de contribuer à l'élaboration du dossier d'enregistrement demandé par l'EFSA (en Europe) ou la CVM/FDA (Etats-Unis d'Amérique). Ces études visent à démontrer l'absence de conséquences négatives des additifs utilisés aux doses recommandées sur la santé animale. Les protocoles d'études, les paramètres étudiés, les types d'analyses statistiques et de rapport font l'objet, soit d'un échange avec les autorités de contrôle (dans le cas de FDA), soit détaillés dans des documents officiels (guidance). Ces attentes ou documents sont susceptibles d'évoluer et il convient donc de s'assurer du caractère actuel des connaissances.

Les études d'efficacité sont réalisées en utilisant des molécules ou mélanges de molécules identifiées lors d'un criblage initial *in vitro*. L'objectif de ces études et les différentes procédures pouvant être utilisées sont déterminés en fonction de la classe de l'additif. Ces études vont permettre d'évaluer les effets des additifs testés principalement sur la croissance, la digestibilité des nutriments, le bilan nutritionnel, la réponse immune, la santé digestive, le microbiote, et la résistance au stress. Ces études peuvent être réalisées en amont de celles visant à démontrer l'innocuité du produit, ou couplés aux études de tolérance, là encore selon les attentes des autorités de contrôle FDA (aux Etats Unis).

Il convient de noter que le criblage *in vitro* mentionné ci-dessus peut avoir été réalisé en interne, au sein du centre de recherche, mais peut également avoir eu lieu en partenariat avec des universités ou des instituts de recherche tiers, publiques ou privés.

La recherche de nouvelles applications pour les additifs existants sur le marché a lieu en mettant en œuvre diverses approches scientifiques, qui vont amener à la réalisation d'études faisant appel à des procédures différentes telles que la résistance au stress ou une carence nutritive, réalisée en alimentant les animaux avec un régime déficient en phosphore et autres minéraux.

La comparaison avec d'autres additifs déjà présents sur le marché ou en développement est réalisée par des tests d'efficacité similaires à ceux utilisés dans le cadre de la découverte de nouveaux additifs.

Le projet s'étend sur 5 années dans le but d'évaluer, de tester et de développer différents additifs alimentaires destinés aux porcs et prévoit l'utilisation de 5000 porcs. Lors du processus de développement et d'enregistrement des additifs alimentaires, il est indispensable de tester l'efficacité des additifs développés sur l'animal auquel il est destiné, afin d'en démontrer l'efficacité et l'innocuité auprès des autorités habilitées à délivrer une autorisation de mise sur le marché. Le projet est conduit dans le respect de la règle des 3R avec comme mesures de raffinement le suivi quotidien de l'état de santé des animaux avec l'observation des points limites adaptés, des conditions d'hébergement définies de telle sorte que l'enrichissement des cages (balles, ballons, croix, jouets en caoutchouc, chaîne, tuyau...), la densité des animaux par cage, ou encore les paramètres environnementaux (température et hygrométrie...) procurent le maximum de confort aux animaux, et restent supérieurs ou égaux à la législation en vigueur (Arrêté du 01/02/2013). En règle générale, aucun animal ne reste isolé, en cage individuelle sans contact olfactif, auditif et visuel avec ses congénères, ceci afin de réduire au minimum l'angoisse et le stress des animaux.

16939 Le cerveau libère dans le sang des hormones qui contrôlent les grandes fonctions (reproduction, croissance, métabolisme, etc.). Pour ce faire, un dialogue intracérébral complexe entre différentes cellules, nerveuses et non-nerveuses, est nécessaire. Le projet consiste à étudier une partie de ce dialogue entre deux types cellulaires précis qui seront rendus visibles et manipulables par l'injection de virus dans le cerveau.

Nous attendons de ce projet une meilleure compréhension du dialogue intracérébral présidant aux grandes fonctions, et donc des pistes de recherche concernant les dérèglements pathologiques de ces fonctions (infertilité, diabète, etc.). Le projet est nouveau et inclut donc des mises au point préalables et des expériences.

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 357 souris C57BL/6J, dont une lignée transgénique non-dommageable de même fond génétique. 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 357 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 (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant...).

16940 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. Egalement des altérations de la structure du sommeil ont été rapportées avec notamment une fragmentation très importante. Ces altérations observées chez l'animal stressé reproduisent celles observées chez l'homme dans le cadre de la Dépression Majeure. Notre demande de projet concerne l'étude des effets d'une exposition à une alcoolisation intermittente de type « binge » chez un modèle animal de stress périnatal.

- Nous voulons analyser les effets de l'alcool sur l'architecture du sommeil et 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 seront accompagnées de prélèvements de structures cérébrales qui seront étudiées suite au traitement à l'alcool.

En plus des femelles utilisées pour la reproduction (n=40) et de 40 mâles reproducteurs, nous estimons que pour mener à bien les expériences proposées, 48 adultes mâles et 48 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 96 animaux, mâles et femelles confondus. Un nombre total de 176 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 à l'alcool à l'âge adulte et son effet sur le sommeil.

- Principe de réduction : 12 rats/groupe/sexe sont nécessaires pour limiter la variabilité interindividuelle des réponses au stress et des traitements à l'alcool et l'obtenir un nombre suffisant d'enregistrements EEG de qualité.

- 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 la chirurgie sera réalisée dans les conditions conformes à la législation afin de respecter le bien-être animal et éviter toute douleur, dans une salle appropriée. De même, l'enregistrement du sommeil sera effectué dans une salle spécifiquement dédiée.

Enfin, seul le personnel habilité en expérimentation animale et en chirurgie réalisera l'ensemble du projet.

16941 La génération de souris et de rats génétiquement modifiés est indispensable pour l'analyse fonctionnelle de gènes, pour la génération de modèles de maladies, pour le développement de médicaments et pour des applications biotechnologiques.

Le choix du rat présente pour de nombreuses études de plus fortes similitudes immunologiques et génétiques avec l'homme que la souris. Il a été précédemment démontré que certains modèles de rats

transgéniques ou KO ou KI reproduisent mieux les pathologies humaines que les modèles souris existants (ex : HIV, HLA B27, DMD...)

Suite aux avancées scientifiques de ces dernières années, des techniques d'ingénierie du génome (ZFNs, Talens, CRISPR/cas9) qui ont permis la création de modèles de rats KO et KI, cela permet à de nombreux chercheurs d'envisager la création de nouveaux modèles.

Nous prendrons en compte tous les éléments nécessaires afin de limiter au maximum la douleur de l'animal. Nous limiterons donc au maximum le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans à 9350 rats (femelles et mâles). Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : Des études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisées au préalable. Mais du fait de l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire, ces études ne peuvent remplacer les études *in vivo*. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité de la suppression ou la délétion d'un gène précis ou d'un changement d'exon visant à la création de nouveaux modèles animaux.

- Réduire : le nombre d'animaux a été réduit à 9350 rats, nombre nécessaire et suffisant pour permettre la génération à façon selon les besoins des différents partenaires de la plateforme. Nous avons également dans ce contexte pu mettre en place une nouvelle technologie qui permet de diminuer de manière très significative le nombre d'animaux utilisés pour la création de ces modèles.

- Raffiner : Un suivi clinique et comportemental des animaux (poils hérissés, dos voûté, agressivité...) sera réalisé. Les animaux montrant des signes caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement ou de souffrance pourront être euthanasiés. De plus, afin de réduire l'angoisse, un produit d'enrichissement (tube en carton ou igloo en PVC (cages portoirs ventilées)) sera utilisée et placée dans les cages. Lors de la procédure chirurgicale et du réveil de l'animal, des tapis chauffants seront utilisés.

16942 La néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA (N-IgA) est une maladie rénale conduisant 30% des patients vers l'insuffisance rénale chronique terminale. Malgré des progrès récents, les mécanismes responsables de cette maladie restent en grande partie inconnus. La N-IgA évolue par poussées, dans les suites d'infections de type angines, sinusites, rhinites, secondaires à des bactéries, dont le streptocoque. Ces infections s'accompagnent de plus d'une apparition dans le sang de protéines de l'inflammation, comme la protéine C-Réactive (CRP). L'élévation de la CRP est un des marqueurs pronostic négatif au moment du diagnostic de N-IgA. L'objectif principal de notre projet est donc d'étudier l'impact de la CRP et des infections à streptocoque dans la N-IgA. En particulier nous chercherons à comprendre si la poussée de la maladie est liée exclusivement à l'élévation de la CRP, à l'effet direct des bactéries ou bien à ces 2 facteurs simultanément. Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons deux modèles de souris : un modèle de souris développant spontanément la N-IgA et un modèle de souris développant spontanément la N-IgA, mais déficitaire en CRP. Ces souris seront colonisées au début du protocole, par voie intranasale par les bactéries (elles porteront les bactéries, sans développer d'infection sévère). Cette manipulation sera effectuée par un expérimentateur entraîné, dans une animalerie de type A2 équipée de cages à filtres et portoirs ventilés. Les souris seront suivies quotidiennement jusqu'à la fin de la procédure durant 4 semaines au total. Les mesures nécessaires à la prise en charge de la douleur seront adaptées en fonction de l'état des animaux. En cas de douleurs, l'administration d'antalgique sera réalisée. L'évaluation des points limites sera également effectuée selon une grille de score adaptée. L'atteinte d'un point limite comme défini par la grille de score conduira à l'euthanasie immédiate de l'animal. Des prélèvements urinaires seront effectués au début, au milieu (2 semaines) et en fin de procédure. Un prélèvement sanguin sera réalisé en début et en fin de procédure. Les souris seront alors euthanasiées. Les prélèvements urinaires et sanguins permettront l'analyse de la fonction rénale et le dosage de la CRP. Les reins seront prélevés en post-mortem à la recherche de signes d'inflammation. Ce projet se déroulera sur une période de 1 an et nécessitera un effectif total de 120 souris adultes dont 60 souris contrôles et 60 souris déficitaires en CRP. La règle des 3R, remplacement, raffinement et réduction sera respectée. Le modèle de N-IgA est complexe, faisant intervenir de nombreux facteurs. Actuellement aucune approche *in vitro* ne permet de reproduire la maladie. Ce modèle de N-IgA n'est à l'heure actuelle pas remplaçable. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. 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.

16943 Trois à cinq enfants sur 1000 souffrent d'Encéphalopathie Hypoxique Ischémique (EHI). C'est une lésion cérébrale induite par des asphyxies (Hypoxie), des arrêts cardiaques (Ischémie), ou des détresses respiratoires au moment de la naissance. Cet événement dans le cerveau immature, et en plus en développement, peut entraîner une mortalité importante et entraîner des déficits neurologiques tels que la paralysie cérébrale, des troubles d'apprentissage, de comportement, et des troubles intellectuels graves.

Il n'existe actuellement aucun traitement pharmacologique assurant une protection contre ces lésions cérébrales chez les nouveau-nés.

Ce projet fournira des données pré-cliniques et des résultats indispensables pour faire progresser le développement d'une nouvelle molécule prometteuse en tant que traitement pharmacologique pour traiter les EHI chez les nouveau-nés. Ce projet permettra de mieux comprendre le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) cette molécule neuro-protectrice, brevetée récemment) atténue les lésions cérébrales induites par une EHI. La stimulation des mécanismes de protection par cette molécule pourrait atténuer considérablement les lésions cérébrales après HI et palier les troubles de l'apprentissage, intellectuels et comportementaux des enfants.

L'utilisation de rongeur va permettre de comprendre précisément les mécanismes de développement des lésions cérébrales et les traitements neuro-protecteurs. Il n'y a pas d'alternative parfaite à un modèle *in vivo* pour étudier les effets de la réduction du flux sanguin/oxygène cérébral sur le cerveau et les anomalies du développement qui en découlent. La relation poumon/cerveau/circulation sanguine ne peut être modélisable *in vitro*. Le rat permettra d'effectuer des mesures biologiques, moléculaires et comportementales qui fourniront des informations pertinentes chez cette espèce. Par ailleurs, le rat de 7 jours correspond à un prématuré 28 semaines, cette correspondance a l'avantage de ne pas impliquer d'intervention *in utero*.

Pour étudier l'effet de cette molécule sur les mécanismes de protection, nous avons recours au modèle d'Encéphalopathie Hypoxique Ischémique (modèle de Rice-Vannucci) chez le raton à 7 jours de vie. Ce modèle va mimer l'interruption de la circulation sanguine cérébrale (l'ischémie) par une ligature permanente de la carotide associée à une privation partielle en oxygène (8% d'oxygène) mimant les détresses respiratoires (l'hypoxie).

Une étude préliminaire sera effectuée avec des doses différentes de la molécule afin de déterminer la dose optimale à administrer pour avoir une protection suffisante. La molécule est administrée en intrapéritonéale sur animal vigile, cette injection ne nécessite pas d'anesthésie. Elle sera effectuée 6h, 24h, 48h après l'HI. Une surveillance clinique sera effectuée en même temps que les injections.

Les animaux seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires, ils seront prélevés 8h, 26h, 50h, 72h, 168h après l'HI afin de réaliser une première étude mécanistique et l'évaluation de la matière grise et blanche cérébrale.

Quand la dose optimale de cette molécule induisant une protection cérébrale sera déterminée, nous passerons à la seconde étude qui permettra de mettre en évidence la neuro-protection de cette molécule par des tests de comportements précoces (8, 9, 10 jours de vie) à moyen terme (13, 14, 16 jours de vie) et à long terme (22, 26, 35, 180 jours de vie).

A la fin de la procédure, les animaux seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires, les cerveaux seront prélevés à 35 et 180 jours de vie afin d'effectuer des analyses du tissu cérébral.

Cette étude durera 5 ans et sera menée sur 414 ratons.

Les procédures sont conformes à la directive du Conseil des Communautés Européennes du 22 septembre 2010 (2010/63/UE).

Remplacer : Ce projet sera mené en parallèle avec une méthode alternative d'un modèle validé de iPSC-humain et les organoïdes humains en 3D. Le but est de traduire les résultats des rongeurs en physiologie/physiopathologie humaine et d'élucider avec précision les mécanismes d'action de cette

molécule dans un contexte cellulaire humain. Toutefois, ce modèle récent a ses limites et ne peut pas remplacer totalement le modèle animal car le cerveau est un organe complexe contenant divers types cellulaires et structures cérébrales.

Réduction : Des recherches antérieures avec ce modèle ont déjà donné des résultats que nous réutiliserons.

Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre d'animaux utilisé. En conséquence, le nombre d'animaux dans notre étude sera maintenu au minimum nécessaire (207 rats pour les tests préliminaires et 207 rats pour les tests de comportements) afin d'obtenir des résultats analysables par les tests statistiques (test de t).

Raffinement : Le suivi des animaux pour l'étude préliminaire (procédure d'HI) ainsi que pour la partie 2 (tests de comportement) sera réalisé avec une grille de scores de points limites, classée en fonction de l'âge des animaux, afin d'être suffisamment prédictif pour éviter toute souffrance.

Étude préliminaire : la procédure d'HI est réalisée sous anesthésie, elle sera effectuée sur un coussin chauffant avec une attention particulière au contrôle de la température. Une fois que les rats auront entièrement récupéré de la chirurgie, dans un environnement à température contrôlée, les rats seront remis à leur mère. Une surveillance clinique sera effectuée 6h après l'HI puis de nouveau à 24h 48h 72h après la chirurgie afin de s'assurer de la bonne cicatrisation de la plaie.

Le traumatisme post-chirurgical est minime et des études antérieures ont indiqué que les rats supportent bien la procédure.

On surveillera la mobilité, la recoloration des extrémités et de muqueuses, la fréquence respiratoire. Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress.

Seconde partie de l'étude : test de comportement

On surveillera l'absence de déplacement spontané, poils ébouriffés, couleur des muqueuses bleutées, respiration anormale.

Les rats seront habitués aux transferts vers la salle de comportement, ils seront habitués à la manipulation par l'expérimentateur et à l'arène vide.

Les rats mâles et femelles seront inclus et les données seront analysées séparément.

16944 Les polluants environnementaux et les agents pathogènes peuvent affecter la santé de la faune sauvage et la dynamique de leurs populations. Si leurs effets individuels sont souvent faibles, l'effet de leur cumul et de leurs interactions restent méconnus. Notre projet, via une approche interdisciplinaire (i.e., suivi démographique, écotoxicologie, génétique des populations, épidémiologie et écologie du mouvement) a pour objectif d'étudier l'effet couplé des polluants (métaux lourds et plastiques) et des parasites sur (i) le succès reproducteur, la dynamique des populations et les déplacements des goélands leucophées (*Larus michahellis*) et, par conséquent, (ii) la circulation de leurs pathogènes à différentes échelles spatiales. Cette espèce de goéland étant fréquente en milieu urbain, les résultats présenteront un intérêt fondamental (i.e., effets des facteurs de stress sur la dynamique des populations de la faune sauvage) et appliqué (i.e., circulation des agents pathogènes et risque d'exposition humaine).

Notre projet implique deux procédures expérimentales. L'une vise à la capture des adultes et à leur marquage suivi de prélèvements de plumes, de cloaque et de sang visant à sexer les oiseaux et à suivre les agents pathogènes et les contaminants qu'ils portent ainsi qu'à mieux connaître leur régime alimentaire via des analyses isotopiques. Des balises GPS seront posées sur une petite partie d'entre eux pour étudier leurs mouvements. La seconde procédure concerne les poussins et implique les mêmes étapes, seule le mode de capture diffère : les adultes sont capturés par piégeage sur nid ou dans des filets verticaux alors que les jeunes sont capturés à la main sur les nids ou à leurs abords. Au total 1300 individus au maximum seront concernés par ces procédures sur 5 ans (1000 juvéniles et 300 adultes).

L'étude porte spécifiquement sur cette espèce d'oiseau identifiée comme un pont épidémiologique entre faune sauvage et populations humaines de par son abondance, son utilisation des espaces urbains et son alimentation en grande partie dépendante des activités humaines. Il est donc nécessaire

d'étudier le goéland leucopnée pour répondre aux enjeux du projet. Un modèle mathématique, des simulations ou un modèle expérimental ne peuvent pas dans l'état actuel des connaissances y suppléer. Le nombre d'individus étudiés envisagé est relativement élevé du fait des nombreux facteurs pouvant interagir (polluants, agents infectieux, comportements etc.) et de la grande variabilité inter-individuelle de ces facteurs. Les procédures envisagées réalisées dans de bonnes conditions ne doivent pas engendrer de douleur intense. Le stress des individus sera minimisé en réduisant le temps de présence sur les colonies et le temps de manipulation de chaque individu.

16945 Les médicaments psychotropes, c'est-à-dire ayant un effet sur l'activité cérébrale, sont utilisés dans plusieurs conditions pathologiques, comme par exemple les troubles d'attention avec hyperactivité. Sont classiquement prescrit pour traiter ces troubles comportementaux le méthylphénidate (Ritaline®) ou la D-amphétamine (Adderall®). Cependant, l'usage thérapeutique de telles molécules psychoactives est souvent détourné et la consommation récréative de ces médicaments psychotropes par des individus sains est en augmentation dans le monde, notamment chez les adolescents. La consommation excessive de telles molécules peut entraîner des troubles du comportement, caractéristiques de l'addiction. Le cervelet est une structure cérébrale qui n'est pas classiquement étudiée quand on s'intéresse aux bases cérébrales des addictions, car jusqu'à maintenant son rôle était peu connu. Récemment, de plus en plus de données indiquent que le cervelet serait impliqué dans le développement de conduites addictives. De manière intéressante, des données suggèrent que les psychotropes modulent l'activité de deux types cellulaires différents dans le cervelet. De plus, les dérégulations induites par les médicaments psychotropes sur le cervelet dépendent de l'âge de l'individu, pouvant s'expliquer par sa maturation lente qui le rend particulièrement sensible à l'adolescence. Il est donc important de comprendre le lien entre la prise des psychotropes médicamenteux à l'adolescence et les modifications physiologiques des principaux types cellulaires du cervelet à l'âge adulte.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'impact de la prise de psychotropes médicamenteux à l'adolescence sur la physiologie cérébelleuse à l'âge adulte.

Nous emploierons trois stratégies complémentaires en parallèle : 1) du séquençage et 2) une étude de l'activité électrique des différents types cellulaires dans le cervelet, ainsi que 3) une approche comportementale.

Ce projet nous permettra d'avoir une vision complémentaire de l'ensemble des mécanismes physiologiques et comportementaux dérégulés par la consommation précoce de psychotropes médicamenteux, permettant ainsi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les conduites addictives.

Nous utiliserons pour cela des lignées de souris transgéniques, qui présentent l'avantage de 1) pouvoir cibler spécifiquement un type cellulaire plutôt qu'un autre, et 2) permettre facilement l'extraction du matériel génétique en vue des expériences de séquençage prévues. Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude est de 1062 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 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 les tests comportementaux, 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 (transgéniques positifs et négatifs) afin de limiter le nombre d'animaux générés sans être utilisés pour l'expérimentation. Le projet traitant de troubles neuropsychiatriques et d'addiction aux psychotropes 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. 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. Enfin, les doses de psychotropes utilisées sont les doses minimales pour observer un effet physiologique tout en limitant les effets délétères, et les animaux sont surveillés étroitement pendant toute la durée de l'effet du

psychotrope pour éviter toute souffrance inutile, dans le cadre de la mise en place de points limites spécifiques et adaptés.

16946 Les événements hypoxiques (une réduction dans la disponibilité d'oxygène dans l'eau) d'origine anthropogénique devraient augmenter en fréquence et en gravité dans les écosystèmes côtiers, représentant un facteur de stress majeur pour les poissons. Cette situation sera exacerbée par un autre facteur de stress concomitant, le réchauffement des températures de la mer. L'hypoxie et le réchauffement partagent un mode d'action physiologique commun chez les poissons. Ces deux facteurs de stress défient la capacité de l'animal à fournir suffisamment d'oxygène aux tissus. Cela peut avoir de graves conséquences au niveau individuel, entraînant une réduction des performances, menaçant même la survie des poissons. Un aspect majeur de la compréhension de la façon dont ces facteurs de stress environnemental vont impacter les populations est l'étude de la variation interindividuelle de la tolérance. L'existence d'une variation de la tolérance peut définir la capacité de la population à persister, voire à prospérer, lorsqu'elle est mise au défi par ces facteurs de stress. En outre, lorsque les individus varient dans leur tolérance à ces facteurs de stress physiologiques, cela permet d'explorer les bases génomiques sous-jacents. La compréhension de ces bases génomiques est très utile pour comprendre si les traits sont héréditaires et peuvent évoluer face aux changements globaux, mais aussi pour mettre en place des stratégies de sélection des familles robustes des espèces de poisson en aquaculture.

L'objectif principal du projet est d'évaluer la variation interindividuelle de la tolérance à l'hypoxie et au réchauffement chez une espèce de poisson de haute valeur économique pour la pêche et l'aquaculture, le bar *Dicentrarchus labrax*. En particulier de tester, par des approches expérimentales et corrélatives, si la tolérance à l'hypoxie et au réchauffement sont corrélées entre eux chez les individus et ont des bases génomiques.

Ce dossier éthique couvre les procédures d'expérimentations sur animaux prévues dans ce projet:

- 1) Marquage intramusculaire par puce pour identification individuelle, et prélèvement d'un bout de nageoire pour génotypage.
- 2) Mesure de traits de tolérance à l'hypoxie par mesures de la consommation d'oxygène (réspirométrie) en chambre métabolique.
- 3) Mesure de traits de tolérance au réchauffement par performance 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 réspirométrie en chambre métabolique seront réalisés sur 1600 poissons marqués et génotypés individuellement, issus d'une étude de leur efficacité alimentaire individuelle et leur tolérance au jeûne. Les effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance statistique de détection suffisante des bases génomiques des traits de tolérance. Pour les mesures de la tolérance thermique en couloir de nage, nous sommes limités à 400 individus pour des raisons de faisabilité technique. Ces 400 individus seront choisis parmi les extrêmes des 1600 individus testés pour leur tolérance à l'hypoxie et nous permettront d'estimer de façon fiable les corrélations avec la tolérance à l'hypoxie, et les bases génomiques des deux traits 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. Les procédures de tolérance à l'hypoxie et au réchauffement 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 chambres expérimentales sans exposition à l'air, suivi par une période d'acclimatation. Les poissons sont à l'abri de toute nuisance visuelle et sonore. 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, 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 ».

16947 La Protoporphyrine Erythroïdique (PPE) est une maladie caractérisée par une photosensibilité très douloureuse due à un déficit en activité d'une enzyme qui participe à la fabrication du sang. Le déficit de cette enzyme entraîne l'accumulation d'un composé photo-toxique dans les globules rouges. L'accumulation de ce composé toxique est responsable de l'apparition des signes cutanés après exposition à la lumière du jour.

Nous avons identifié précédemment une molécule thérapeutique qui permet de corriger efficacement dans des boîtes de culture de cellules du sang issues de patients atteints de PPE, le déficit de l'enzyme et ainsi de diminuer l'accumulation du composé photo-toxique.

La prochaine étape de notre étude vise à démontrer l'efficacité de notre molécule thérapeutique *in vivo* chez la souris avant de la tester chez l'homme.

Pour tester cette molécule, sans qu'il y ait de barrière inter espèce, nous proposons de réaliser des greffes des cellules du sang de patients atteints de PPE chez les souris. Une lignée des souris déficientes pour le système immunitaire qui n'a pas besoin d'être irradiée pour accepter la greffe des cellules du sang a été produite. Effectuer la greffe des cellules du sang sans irradiation facilite les expériences, supprime les complications liées à l'irradiation des animaux et diminue donc la souffrance des animaux. La greffe de cellules de sang humain n'entraîne pas l'apparition de la maladie chez la souris car les globules rouges greffés restent dans la moelle osseuse et le composé photo-toxique ne diffuse pas dans la peau.

Ce projet est une étude pilote qui vise à déterminer :

1-Le taux de greffe avec des cellules du sang de malade PPE :

L'objectif est de mesurer l'efficacité de la prise de la greffe des cellules du sang issu de patients atteints de PPE. Les données sur le sang de malades atteints de PPE n'existent pas et nous devons donc commencer par injecter ces animaux avec le sang de malade pour savoir si nous obtiendrons des résultats différents de ceux obtenus avec le sang de sujet sain. Avec les cellules du sujet sain le taux de greffe est proche de 100 %. Selon le taux de prise de greffe, nous pourrions évaluer précisément le nombre d'animaux nécessaires pour les expériences suivantes.

Nous allons donc injecter aux souris, par la veine de la queue, les cellules du sang issues des malades PPE. La présence des cellules humaines (globules blancs qui passent dans le sang contrairement aux globules rouges qui ne sortent pas de la moelle dans ce modèle murin) exprimant des marqueurs spécifiques, sera évaluée tous les 15 jours à partir de la sixième semaine dans le sang périphérique des souris. Cela permettra de savoir chez quelle souris la greffe a pris. Les prélèvements de sang seront effectués sans anesthésie par la veine de la queue. Au bout de 10-12 semaines après l'injection des cellules humaines, on sacrifiera les souris pour mesurer dans le sang et la moelle osseuse différents éléments confirmant la prise de la greffe.

2- Evaluation de la réponse aux traitements et de sa variabilité entre les animaux :

L'objectif est de définir l'importance de l'effet du traitement et de la variabilité de la réponse entre les animaux pour calculer le nombre d'animaux nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Dix semaines après l'injection des cellules humaines chez les souris et la confirmation de la prise de greffe, nous allons injecter, par la veine de la queue, différentes conditions thérapeutiques avec deux doses différentes. 24 à 48 H après le traitement, les souris seront sacrifiées afin de leur prélever la moelle osseuse et d'y mesurer le niveau de composé toxique dans les globules rouges.

Ce projet nécessite un nombre total de 42 souris et sera mené sur une durée de 5 ans.

La démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R :

1- Respect de la règle du remplacement : Nous avons montré précédemment l'efficacité de notre traitement, *in vitro*, dans des boîtes de culture cellulaire. Dans des boîtes de culture, il est impossible d'étudier les interactions éventuelles entre notre molécule thérapeutique et les différents organes. La souris pourrait être l'organisme modèle qui nous permettra d'étudier en détail ces interactions. En outre,

les agences du médicament exigent la validation de l'efficacité d'un traitement chez les souris avant de le tester chez l'homme. Par conséquent, nous devons obligatoirement tester notre molécule thérapeutique chez la souris et il n'est donc pas possible de remplacer ce modèle animal par d'autres approches.

2-Respect de la règle de réduction : Afin de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons divisé notre étude en deux parties principales commençant par l'évaluation du taux de prise de greffe suivi par l'évaluation de la dose optimale et le nombre d'animaux nécessaires pour montrer l'efficacité thérapeutique. En fonction des résultats de cette étude préliminaire nous allons faire un avenant sur APAFIS pour la suite de notre projet car nous aurons les éléments nécessaires pour calculer le nombre exact d'animaux dont nous avons besoin pour valider statistiquement notre approche thérapeutique.

3- Respect de la règle du raffinement : Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place des conditions maximales pour éviter l'inconfort et la douleur des souris. Il y a aucune raison scientifique ni médicale d'anticiper que le traitement par la molécule thérapeutique engendre une quelconque souffrance. Les signes extérieurs de souffrance (état prostré, poils hérissés, yeux fermés) seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasiée. Puisque ces souris sont déficientes pour le système immunitaire, elles sont produites et élevées en zones propres.

Les souris qui n'atteindront pas les points limites et n'auront pas une prise de greffe efficace ne seront pas utilisées pour nos expériences et seront donc euthanasiées.

16948 La question de la mémoire immunitaire est au centre de la thématique de la vaccination. La vaccination est l'une des mesures sanitaires les plus efficaces et les plus économiques selon l'OMS. Bien que l'efficacité de la vaccination ne soit plus à prouver, plusieurs questions demeurent encore sans réponse. Pourquoi la longévité de la protection offerte par certains vaccins (tétanos, diphtérie) est-elle très limitée dans le temps alors que d'autres vaccins (rougeole) sont capables d'induire une immunité à vie ? Quels obstacles s'opposent à la génération de vaccins contre HIV ou de vaccins "universels" permettant de conférer une immunité contre de multiples souches du virus de la grippe ? Pour progresser dans la compréhension de cette hétérogénéité de la réponse vaccinale, une meilleure connaissance des mécanismes fondamentaux impliqués dans l'établissement de la mémoire immunologique est nécessaire. L'une des avancées récentes dans ce domaine est la découverte que la mémoire immunologique des lymphocytes B (LB) est complexe et multifactorielle. Plusieurs populations lymphocytaires B sont impliquées à des niveaux différents de la réponse mémoire. Les LB à mémoire expriment une molécule d'immunoglobuline membranaire appelée aussi récepteur à l'antigène (ou BCR en anglais). Ils peuvent détecter et capter l'antigène (Ag) et générer une réponse anticorps (Acs) accélérée et amplifiée. A l'inverse, les plasmocytes (PCs) à mémoire ne possèdent pas de BCR mais produisent spontanément des Acs protecteurs longtemps après extinction de l'infection, constituant ainsi une barrière sérologique à la réinfection. Une nouvelle composante de la mémoire immunitaire des lymphocytes B a été récemment identifiée. Il s'agit de cellules qui partagent les caractéristiques des LB à mémoire (expression d'un BCR) et celles des PCs à mémoire (sécrétion d'Acs). Elles sont désignées sous le terme de PCs à mémoire non conventionnels (ncPCs). Par ailleurs, outre leur capacité de sécrétion d'Acs, ces cellules produisent des médiateurs appelés cytokines capables de réprimer ou d'amplifier la réponse immunitaire. La contribution des ncPCs à la protection vaccinale, de même que les fonctions biologiques de leur récepteur antigénique, sont inconnus. Le but de ce projet est d'abolir l'expression ou la fonction du BCR des ncPCs chez la souris et d'analyser comment ces altérations affectent la réponse vaccinale soit à des Ags vaccinaux modèles, soit à une stimulation bactérienne.

Remplacement : ce projet nécessite l'emploi d'un modèle animal car l'efficacité vaccinale ne peut pas être analysée *in vitro* puisqu'elle mobilise de multiples acteurs du système immunitaire. Ce type d'étude ne peut être conduit que dans un organisme vivant entier (vacciné ou non) chez lequel on peut mesurer la réponse immunitaire et le développement de signes cliniques en réponse à un Ag ou à un agent infectieux.

Raffinement : les prélèvements sanguins et injections seront réalisés sous anesthésie afin de limiter toute souffrance animale de même que le stress induit par le geste. Les animaux seront hébergés par

groupes de 4 pour limiter le stress lié à l'isolement. Tous les animaux feront l'objet d'un suivi régulier de leurs paramètres physiques et comportementaux pour prévenir toute souffrance.

Réduction : le projet implique le recours à 460 souris au maximum. Ce nombre a été calculé par des méthodes biostatistiques et correspond au nombre d'animaux strictement nécessaires pour répondre à la problématique posée. Tous les outils et techniques d'étude (procédures d'analyse des réponses biologiques, identification des cellules d'intérêt par marquage fluorescent) ont déjà été maîtrisés dans le contexte de projets antérieurs permettant ainsi de réduire au maximum les expériences de mises au point technologiques et par conséquent de limiter le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation du projet.

16949 Les maladies à transmission vectorielle représentent un défi majeur en matière de santé publique et de développement économique. La Réunion et les îles du sud-ouest de l'Océan indien (SOOI) ont été victime ces dernières années d'émergences épidémiques de nombreuses arboviroses d'importance médicale. C'est par exemple le cas du chikungunya qui a frappé durement La Réunion et l'ensemble de la région surtout en 2006.

L'objectif de ce projet est d'examiner le rôle des moustiques vecteurs dans la dynamique de transmission des arbovirus dans les îles du SOOI. A cet effet, la compétence vectorielle des moustiques échantillonnés à la Réunion et dans d'autres îles du SOOI sera examinée. Les expériences pour mesurer la compétence vectorielle seront réalisées en laboratoire confiné de niveau 3, avec les virus Zika et le virus de la dengue. Nous effectuerons des infections expérimentales par gorgement des femelles de moustiques sur membranes artificielles. Le repas de sang infectieux sera composé d'un mélange de sang de lapin, de virus et d'ATP (Adénosine Triphosphate) utilisé comme phagostimulant. Différents tests effectués par un consortium de laboratoire de recherche travaillant sur ZIKA ont démontré que l'origine du sang utilisé affecte l'infection virale et la dissémination. Ces résultats démontrent que le sang de lapin a une efficacité optimale (en comparant avec du sang de boeuf) de l'infection et de la dissémination du virus ZIKA.

Pour le projet nous utiliserons deux lapins KBL(NZW) mâles de 11 semaines par an, pendant 3 ans soit 6 animaux sur toute la durée du projet, que nous ponctionnerons toutes les semaines à tour de rôle car l'idéal c'est d'espacer de deux semaines les prélèvements pour chaque lapin en ne dépassant pas 10% du volume totale (environ 6ml pour un lapin de 1kg), l'animal ne subissant aucune contrainte notable due à une telle perte de sang. La ponction de la veine marginale de l'oreille est la méthode à choisir chez le lapin. La vasodilatation, si elle est nécessaire, sera provoquée par l'application d'une substance légèrement irritante (éthanol 70°) qui sera enlevée de l'oreille après le prélèvement de sang. Avant chaque prélèvement nous appliquerons du désinfectant (dakine) nous appliquerons également une pommade anesthésiante (lidocaïne) au niveau du site de prélèvement, et. Les lapins seront hébergés dans une animalerie agréée, et, mis dans des cages adaptées avec un enrichissement comprenant mélange de fourrage ainsi que cube de bois. Lors des prélèvements les lapins seront disposés dans des cages de contention adaptées et seront manipulés par du personnel compétent. Selon les recommandations d'hébergement d'animaux de laboratoire et d'après la réglementation européenne de 2013 sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques nos cages d'hébergement sont des cages pour des lapins de 5kg maximum (au bout de 13 mois environ), au-delà nous ne pouvons pas garantir le bien-être des animaux. Les animaux seront donc euthanasiés.

16950 Ce projet aborde les mécanismes de la progression de la maladie rénale chronique (MRC) due à l'acidose métabolique. 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. Nous faisons l'hypothèse selon laquelle les mécanismes physiologiques rénaux d'adaptation à l'acidose métabolique chronique entraînent des modifications drastiques du métabolisme des cellules tubulaires rénales qui activeraient des voies pro-inflammatoires et pro-fibrosantes. Ce projet est une continuité d'un projet antérieur au cours duquel nous avons pu mettre en évidence la présence anormale de larges vacuoles intracytoplasmiques dans les cellules tubulaires proximales et des modifications transcriptionnelles drastiques de la voie de la phosphorylation oxydative mitochondriale (Analyse des données RNAseq) induites par l'acidose métabolique.

L'objectif ici est d'évaluer le status mitochondrial rénal au cours de l'acidose métabolique par imagerie TEP à l'aide de deux radiotraceurs, le F18BCPP-BF et le 18F-DPA-714, qui se lient spécifiquement à des protéines mitochondriales. Il est nécessaire d'avoir recours à l'animal pour ce projet car notre objectif est de mesurer le status mitochondrial rénal au cours de l'acidose métabolique chronique et il existe aucun modèle *in vitro* ou *in silico* pour se faire.. Une acidose métabolique sera induite chez des souris sauvages C57Bl/6J par l'administration de chlorure d'ammonium dans l'eau de boisson pendant 3 à 60 jours. Ce modèle a été validé dans notre étude précédente autorisée par les autorités compétentes. Les souris seront étudiées à 5 temps différents pendant cette période.

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, cycle jour-nuit 12h/12h, ventilation, bruit). De plus, les cages sont équipées d'enrichissement pour limiter le stress et les souris sont hébergées en groupes sociaux afin de limiter l'isolement. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une observation quotidienne des animaux sera réalisée par les membres de l'équipe de l'animalerie dans laquelle les animaux sont hébergés et les animaux seront pesés deux fois par semaine pendant toute la durée du protocole. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant le retrait ou la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale et les souris seront profondément anesthésiées avant l'euthanasie. Ce projet s'inscrit sur une durée de 1 an. Le nombre de souris utilisées sera de 80 au total.

A long terme, les résultats de ce projet nous permettront de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent les effets de l'acidose métabolique dans la progression de la MRC. Ils pourraient donner de nouvelles pistes pour le développement de nouveaux traitements ciblant les voies mises en cause, permettant le ralentissement de la progression de la MRC, et repoussant ainsi la nécessité d'un traitement substitutif comme la dialyse ou la transplantation rénale.

16951 Chez l'homme comme chez la souris l'administration d'hormones thyroïdiennes augmente la dépense d'énergie.

L'hypothyroïdie est associée à une masse corporelle élevée ainsi qu'à une hypersensibilité au froid, au contraire l'hyperthyroïdie est associée à une masse corporelle moindre et à une hypersensibilité à la chaleur. Les hormones thyroïdiennes sont donc des acteurs clés de la thermogénèse adaptative qui permet à l'organisme de dépenser un excès d'énergie en particulier en réponse à un excès calorique pour limiter le gain de poids et en réponse au froid pour maintenir la température corporelle. Les hormones thyroïdiennes peuvent agir soit dans le cerveau où elles stimulent le système nerveux sympathique qui utilise la voie nerveuse pour stimuler les organes métaboliques soit directement dans ces organes métaboliques comme le tissu adipeux brun. Ce dernier est spécialisé dans la dissipation d'énergie et la production de chaleur.

Le système nerveux sympathique participe aussi à la régulation de la dépense énergétique en réponse au froid et à un régime hypercalorique. Il est activé dans l'hypothalamus et stimule en retour les tissus périphériques dont le tissu adipeux brun via les récepteurs β -adrénergiques pour stimuler la dépense d'énergie. De nombreuses données de la littérature montrent qu'il existe une interaction entre ces deux voies de signalisation. Certaines études montrent en particulier que dans les adipocytes bruns, une hypothyroïdie locale est associée à une signalisation β -adrénergique faible. D'autres au contraire montrent qu'en cas d'hypothyroïdie, on note une hyperactivation du système nerveux sympathique, permettant de maintenir, un signalisation β -adrénergique normale dans les tissus cibles même si une résistance existe dans ce tissu.

Ce projet étudie comment ces deux voies de signalisation interagissent en se focalisant sur trois types cellulaires : les neurones qui sont les cellules qui « émettent » le signal β adrénergique, les tanocytes qui sont les seules cellules du cerveau qui produisent des hormones thyroïdiennes et les adipocytes bruns spécialisés dans la dépense d'énergie.

La norépinéphrine est une substance agoniste des récepteurs β -adrénergiques. Dans la procédure 1, le mode d'administration de la norépinéphrine le plus adapté pour observer une réponse robuste dans les cellules d'intérêt, mesurée par expression de gènes dans ces cellules sera déterminé. Cette réponse sera aussi évaluée en fonction du statut thyroïdien (hypothyroïdie versus euthyroïdie).

Dans la procédure 2 des souris génétiquement modifiées pour invalider la signalisation des hormones thyroïdiennes, sélectivement dans les trois types cellulaires d'intérêt : les neurones, les tanocytes et les adipocytes bruns, seront utilisées. De la norépinéphrine sera administrée selon le mode déterminé en procédure 1. Les objectifs sont de déterminer d'une part si l'absence de la signalisation des hormones thyroïdiennes dans un tissu affecte celle des récepteurs β -adrénergiques dans un autre tissu et d'autre part d'identifier les cibles communes à ces deux régulations au sein d'un type cellulaire, et donc les mécanismes responsables de l'interaction entre ces deux voies de signalisation.

Aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle murin pour ce type d'études physiologiques qui impliquent la communication entre différents organes. Les mécanismes sont complexes et doivent être envisagés à l'échelle de l'organisme entier.

Un suivi adapté à chaque procédure a été mis en place et des points limites suffisamment prédictifs ont été fixés pour éviter toute souffrance des animaux et au-delà desquels la procédure est arrêtée. Au sein d'une même procédure une période de récupération est prévue entre les différentes interventions pour limiter la souffrance des animaux. Le maintien en groupes sociaux et l'utilisation d'anesthésiques permettent aussi d'éviter le stress et de limiter tout risque de souffrance. Le nombre minimal d'individus nécessaires a été calculé au plus juste pour permettre l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 320 souris.

16952 La kisspeptine est un puissant stimulateur de la sécrétion de la GnRH. Son rôle dans la mise en place de la puberté ainsi que dans l'induction du pic pré-ovulatoire de la LH sont clairement établis. Nos résultats ont permis de montrer, suite à l'administration d'un analogue de la kisspeptine, nommé C6, l'induction de l'ovulation à tout moment de l'année chez la brebis prétraitée avec un progestagène. En outre l'administration de C6 avance la puberté chez les souris. Notre objectif est maintenant de s'affranchir du prétraitement avec le progestagène, ce qui demande une stimulation de la sécrétion de la LH plus longue. Des tests préliminaires faits chez la brebis, ont montrés que la sécrétion de la LH revient au niveau basal quand la concentration de l'analogue dans le sang est encore relativement élevée. Cette disparition de l'effet pourrait être lié à la capacité du C6 de passer ou non la barrière hémato-encéphalique. Afin de vérifier cette hypothèse et pouvoir trouver une solution au problème, nous avons besoin de mieux caractériser le mode d'action de notre analogue. L'objectif étant de savoir si notre analogue franchit la barrière hémato-encéphalique afin d'aller stimuler les neurones à GnRH, ou alors si celui-ci ne franchit pas la barrière et agit seulement au niveau des terminaisons de ces neurones qui se trouvent en dehors de la barrière hémato-encéphalique. Dans ce dernier cas, la quantité de GnRH présente au niveau des terminaisons serait limitante pour une stimulation de longue durée. Pour vérifier cette hypothèse, nous allons mesurer le contenu en GnRH au niveau de l'aire pré-optique (lieu où sont localisés les neurones à GnRH) et au niveau de l'éminence médiane (lieu où sont localisées les terminaisons des neurones à GnRH) pour vérifier si, suite à une administration de notre analogue (par voie centrale ou périphérique), il y a épuisement ou non du stock de GnRH. En parallèle nous étudierons l'activation neuronale induite par l'injection de l'analogue de la kisspeptine.

Par ailleurs la synthèse et la sécrétion de la GnRH est sous l'influence des hormones stéroïdes sexuelles (estradiol et testostérone). Pour prendre en compte aussi cet aspect nous étudierons l'importance de l'estradiol et de la testostérone dans la libération de la LH en réponse à l'injection de l'analogue de la kisspeptine.

Pour cette étude, nous utiliserons le modèle murin puisque nos travaux précédents ont porté sur celui-ci et que le système neuroanatomique murin est très bien caractérisé.

Afin de vérifier nos hypothèses, différents groupes d'animaux seront nécessaires: intact, gonadectomisés, gonadectomisés et canulés au niveau du ventricule latéral, mâles et femelles pour un

total, variable selon les résultats, entre 190 et 296 souris au maximum. Les différents groupes seront traités avec des injections centrales ou périphériques.

Réduire. Les procédures chirurgicales ont été étudiées afin de réduire au minimum toute possible souffrance: elles seront effectuées par du personnel qualifié, des traitements analgésiques appropriés seront appliqués et un suivi post-opératoire strict sera mis en œuvre. Le jour de l'injection, les animaux seront mis à mort selon une procédure couramment utilisée et leur cerveau sera prélevé afin d'effectuer les analyses de contenu en GnRH et en immunohistochimie. Pour les animaux avec une implantation de canule intracérébroventriculaire (icv) nous prévoyons d'utiliser pour la quantification de la GnRH au maximum 10 souris par lot, pour garantir 7 souris nécessaires pour l'étude statistique et pour la réalisation de l'immunohistochimie un maximum de 7 souris par lot pour garantir 5 souris nécessaires pour l'étude statistique. Comme nous ne nous attendons pas à avoir une différence de perméabilité de la barrière hématoencéphalique entre mâle et femelle, pour réduire le nombre d'animaux utilisés nous allons effectuer l'expérience uniquement chez le mâle entier. Pour réduire ultérieurement le nombre de souris utilisées nous avons envisagé une première expérience qui permettra de répondre à la question du passage ou non de la barrière hématoencéphalique. Si la molécule passe la barrière, nous pourrons utiliser pour les études de l'influence des hormones sexuelles uniquement des injections intrapéritonéales (ip). Cela permettra de réduire le nombre de souris utilisées d'un maximum de 296 à un maximum de 190.

Remplacer. Concernant la question du franchissement de la barrière hémato-encéphalique par notre analogue il n'y a pas à présent d'autre moyen fiable pour tester cette hypothèse que d'effectuer une comparaison entre une injection périphérique et une injection centrale pour suivre l'activation neuronale. Il n'est pas possible non plus d'utiliser des modèles *in vitro* pour les études sur le contenu de GnRH après traitement.

Raffiner. Dès que les souris canulées seront hébergées en case individuelle et donc privées d'interactions avec leurs congénères, pour leur permettre de manifester la plus ample gamme possible de comportements typiques de l'espèce le milieu sera enrichi avec des objets tels que tubes, petite boîte de carton, matériel pour la construction du nid, etc.

16953 Le développement d'additifs alimentaires (comprenant de manière non-exclusive vitamines et métabolites, caroténoïdes, enzymes, immunostimulants, probiotiques, prébiotiques, modulateurs métaboliques du microbiome, acides organiques, et huiles essentielles) a pour objectif l'amélioration de la nutrition et de la santé animale. Les enzymes ont pour but d'améliorer la valeur nutritive des ingrédients utilisés dans les aliments pour poissons, ou d'améliorer celle d'un nouvel ingrédient. Les caroténoïdes sont utilisés dans la pigmentation de la chair des poissons. Les vitamines sont ajoutées à l'aliment sous forme de prémélanges et sont indispensables à la croissance des poissons. Les immunostimulants, prébiotiques et probiotiques permettent d'améliorer le bien-être des animaux d'élevage tout en réduisant les effets de stress potentiels et en améliorant leurs défenses immunitaires. Les acides organiques, les huiles essentielles ou des combinaisons de ces produits sont développés comme alternatives à l'utilisation des antibiotiques, afin d'améliorer la santé gastro-intestinale des animaux, ainsi que leur performance.

Le présent projet a pour objectifs principaux :

- de contribuer à la découverte de nouveaux additifs alimentaires.
- d'étudier l'efficacité d'huiles et de protéines alternatives aux farines et huiles de poissons, de réaliser des études d'efficacité et de tolérance pour l'enregistrement de ces additifs.
- de rechercher de nouvelles applications pour les additifs déjà enregistrés.
- de comparer l'efficacité des additifs développés par notre établissement avec ceux du marché.

Le développement d'additifs alimentaires passe nécessairement par une étape d'enregistrement des dits additifs auprès des autorités compétentes. A cet effet, certains types d'études doivent donc être menés, selon des modalités propres à chaque organisme d'autorisation, par exemple l'EFSA en Europe ou CVM/FDA aux Etats-Unis d'Amérique. Malgré des différences notoires dans les attentes des différents organes de régulation, il est possible de séparer les essais en deux grandes catégories, des

essais d'efficacité, visant à démontrer l'utilité d'un produit d'une part, et les essais de tolérance visant à démontrer son innocuité aux doses recommandées d'autre part.

Des études de tolérance peuvent être réalisées afin de contribuer à l'élaboration du dossier d'enregistrement demandé par l'EFSA (en Europe) ou la CVM/FDA (Etats-Unis d'Amérique). Ces études visent à démontrer l'absence de conséquences négatives des additifs utilisés aux doses recommandées sur la santé animale. Les protocoles d'étude, les paramètres étudiés, les types d'analyses statistiques et de rapport font l'objet, soit d'un échange avec les autorités de contrôle (dans le cas de la FDA), soit sont détaillés dans des documents officiels (guidance). Ces attentes ou documents sont susceptibles d'évoluer et il convient donc de s'assurer du caractère actuel des connaissances.

Les études d'efficacité sont réalisées en utilisant des molécules ou mélanges de molécules identifiées lors d'un criblage initial *in vitro*. L'objectif de ces études et les différentes procédures pouvant être utilisées sont déterminés en fonction de la classe de l'additif. Ces études vont permettre d'évaluer les effets des additifs testés principalement sur la croissance, la digestibilité des nutriments, le bilan nutritionnel, la réponse immunitaire, la santé digestive, le microbiote, la pigmentation et la résistance au stress. Ces études peuvent être réalisées en amont de celles visant à démontrer l'innocuité du produit, ou couplées aux études de tolérance, là encore selon les attentes des autorités de contrôle FDA (aux Etats Unis).

Il convient de noter que le criblage *in vitro* mentionné ci-dessus peut avoir été réalisé en interne, au sein du centre de recherche, mais peut également avoir eu lieu en partenariat avec des universités ou des instituts de recherche tiers, publiques ou privés.

La recherche de nouvelles applications pour les additifs existants sur le marché a lieu en mettant en œuvre diverses approches scientifiques, qui vont amener à la réalisation d'études faisant appel à des procédures différentes, telles que la résistance au stress ou l'efficacité des enzymes. La comparaison avec d'autres additifs déjà présents sur le marché ou en développement est réalisée lors des tests d'efficacité similaires à ceux utilisés dans le cadre de la découverte de nouveaux additifs.

Le projet s'étend sur 5 années, dans le but d'évaluer, de tester et de développer différents additifs alimentaires destinés aux poissons, et prévoit l'utilisation de 40 000 poissons. Il est conduit dans le respect de la règle des 3R avec comme mesure de raffinement, l'anesthésie des animaux à la tricaine méthanesulfate avant toute manipulation ou prélèvement en cours d'étude, le suivi quotidien de l'état de santé des animaux avec l'observation des points limites adaptés, des conditions d'hébergement définies de telle sorte que la densité des animaux par bassin, les paramètres environnementaux (température...) ou encore la qualité d'eau procurent le maximum de confort aux animaux, et restent supérieurs ou égaux à la législation en vigueur (Arrêté du 01/02/2013). En règle générale, aucun animal ne reste isolé sans contact visuel ou tactile avec ses congénères, ceci afin de réduire au minimum l'angoisse et le stress des animaux.

16954 La médecine individuelle de la poule connaît un succès croissant ces dernières années du fait de l'augmentation de la détention de cette espèce comme animal de compagnie et parce que le nombre des vétérinaires les soignant augmente continuellement. L'enseignement de la médecine de la poule de compagnie nécessite, en premier lieu, des compétences en propédeutique de cette espèce et la maîtrise d'un certain nombre de gestes techniques (prélèvements, administration de traitements médicamenteux). Ce projet vise à proposer aux vétérinaires praticiens en exercice d'acquérir des compétences nécessaires à une prise en charge médicale adaptée à la poule de compagnie. L'acquisition de certaines de ces compétences ne peut se faire que sur animal vivant ; c'est notamment le cas de la contention, d'une partie de l'examen clinique (auscultation) et de certains prélèvements et modalités d'administration de traitements (utilisation des voies veineuses). Pour ce faire, l'utilisation de poule (*Gallus gallus domesticus*) adulte femelle est l'idéal, cette catégorie étant la plus détenue par les particuliers. Afin de répondre aux besoins de formation, d'assurer un enseignement de qualité tout en optimisant le nombre d'animaux utilisés, un ratio de 1 poule pour 2 vétérinaires formés est le meilleur compromis. Cela correspond à l'utilisation de 135 poules sur 5 ans (9 poules par session de formation).

Sur ces poules, les vétérinaires apprendront les procédures suivantes après démonstration par un formateur :

- Ecouvillon trachéal ;
- Prise de sang à la veine jugulaire et à la veine basilaire (les volumes sanguins prélevés seront négligeables par rapport à la masse sanguine totale) ;
- Pose de cathéter intraveineux à la veine métatarsienne médiale.

Les animaux, issus d'un élevage commercial, sont des poules de réformes initialement destinées à être envoyées à l'abattoir. Elles seront hébergées en animalerie selon la directive européenne 2010/63/EU, relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, et l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. Les soigneurs qui s'occupent des animaux possèdent une formation expérimentation animale (utilisation et protection des animaux de laboratoire) niveau applicateur. A l'issue de la formation, les animaux seront euthanasiés et le reste de la formation sera faite sur les animaux morts (une partie des gestes enseignés devant être pratiqués sur animaux morts, notamment l'autopsie).

Le choix des procédures a été fait en tenant compte de la règle des 3Rs. Notamment, le nombre d'animaux est réduit tout en garantissant un ratio animal / formés cohérent avec les objectifs de formation, le stress est limité en acclimatant les oiseaux plusieurs jours avant les procédures, en les maintenant dans des conditions d'hébergement en accord avec la directive européenne. Enfin, le jour de la formation, les animaux seront placés individuellement dans des boîtes de transport munies de grilles (type "boîte à chat") et couvertes, afin d'assurer la ventilation et de limiter le stress.

16955 Les mycobactéries forment un groupe bactérien d'une grande diversité incluant les mycobactéries non tuberculeuses (MNT). Parmi ces MNT, *Mycobacterium abscessus* est responsable de pathologies humaines graves, majoritairement des infections pulmonaires (particulièrement sévère chez des patients atteints de mucoviscidose) et cutanées. Malgré l'établissement d'une antibiothérapie lourde, l'éradication des bactéries reste souvent un échec, les MNT étant intrinsèquement résistantes à la plupart des classes d'antibiotiques. La mise au point de vaccins et de traitements efficaces est donc capital. Pour cela, il est primordial de développer des modèles expérimentaux permettant des études fondamentales destinées à décrire les mécanismes de la pathogenèse et à identifier de nouveaux traitements d'intérêt pharmacologique.

Nous utilisons couramment des lignées cellulaires de macrophages pour démêler les étapes précoces des relations hôte-MNT. Cependant, une cellule isolée ne permet pas de reproduire la complexité d'un organisme entier. Dans ce contexte, notre projet a pour but de développer des modèles d'infection *in vivo* de plusieurs MNT afin d'évaluer et de proposer de nouvelles approches thérapeutiques contre ces maladies infectieuses.

Soucieux de Remplacer le modèle souris (qui n'est pas permissif à l'infection par *M. abscessus*), nous nous sommes tournés vers le zebrafish. Nous estimons avoir besoin de 13 000 larves de plus de 5 jours pour ce projet conforme à la règle des « 3R ».

La transparence optique des larves permet le suivi spatiotemporel non invasif du processus infectieux *in vivo* sur un même individu. L'imagerie permet donc de Réduire au minimum par trois le nombre d'animaux étudiés par rapport aux procédures expérimentales « classiques ». Par ailleurs, le zebrafish est établi comme un modèle de choix pour le criblage à haut débit de molécules d'intérêt thérapeutique. Ainsi, avec un nombre d'animaux raisonné nous pourrions identifier de nouvelles molécules antibactériennes et lutter contre l'extrême résistance des MNT aux antibiotiques. Afin de Raffiner nous réalisons nos expériences par balnéation (méthode non-invasive) ou sous anesthésie légère. Une surveillance quotidienne des points limites définis, tenant compte des symptômes spécifiques à l'infection, permet d'établir s'il est nécessaire d'anticiper l'arrêt de la procédure. Toutefois, ces points limites sont très rarement atteints puisque la majorité de nos procédures s'arrêtent avant l'apparition de ces symptômes.

16956 Notre équipe de recherche est orientée vers l'étude de la physiopathologie des maladies génétiques du retard mental et de l'épilepsie. Nous étudions plusieurs gènes impliqués dans ces maladies. L'objectif général de notre travail est de mieux comprendre le rôle de ces gènes, et des protéines pour lesquelles ils codent, dans le système nerveux central (SNC) et d'éclaircir les mécanismes physiopathologiques. Pour cela, nous utilisons des modèles souris mutantes (transgéniques ou spontanées).

Mise en œuvre pratique des 3 R :

- Remplacer : Une partie de notre projet est réalisé *in vitro* (biochimie et biologie cellulaire), nous utilisons des lignées cellulaires et des cellules souches embryonnaires afin de limiter le nombre d'animaux. Mais pour des raisons scientifiques (difficulté d'étudier le cerveau en culture) nous devons caractériser ces maladies sur le modèle murin. La plupart des gènes que nous étudions sont spécifiquement exprimés dans le SNC et ne sont pas exprimés dans les lignées cellulaires, d'où la nécessité d'étudier les cellules neuronales dans les cerveaux des modèles murins. En effet, les modèles murins que nous étudions sont à ce jour les seuls modèles disponibles. Ils présentent l'avantage de mimer assez bien le phénotype humain. Le développement du cerveau est en effet bien conservé chez la souris, surtout pour les étapes de développement du cerveau qui nous intéressent, favorisant l'identification de phénotypes robustes.

- Réduire : Nous réduisons le nombre d'animaux en combinant plusieurs approches expérimentales sur une même lignée. De plus, chez la souris, la période de gestation est courte et le nombre d'embryons important, ce qui nous permet de générer un nombre d'animaux suffisant pour plusieurs expériences à partir de relativement peu de fondateurs. Nous comparerons également des souris de type sauvage (WT) et mutantes issues de la même portée, avec une répartition mendélienne. De même, tous les animaux générés (femelles et mâles) sont informatifs.

Nos connaissances des protocoles nous ont permis d'évaluer le nombre d'animaux au plus juste pour chaque expérience, en tenant compte de l'importance de l'effet attendu pour assurer une parfaite robustesse des résultats. Pour chacune des approches expérimentales, des travaux antérieurs nous ont permis de calculer le nombre juste d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique et robuste les conditions mutantes à la condition contrôle avec une excellente reproductibilité. Une étude statistique a donc été réalisée pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour chaque lot.

Les lignées de souris mutantes représentent des modèles de déficits intellectuels, pour lesquels il est important de continuer la caractérisation afin d'éclaircir la physiopathologie. Pour cela, nous analyserons l'anatomie et la morphologie du SNC de ces souris mutantes, par des méthodes d'histologie, d'immunohistochimie et de microscopie. L'objectif est d'identifier et d'étudier les anomalies du SNC associés aux inactivations de gènes d'intérêt. Des travaux précédents nous ont permis de valider l'analyse des régions cérébrales considérées avec une excellente reproductibilité et donc de réduire le nombre d'animaux requis.

L'inactivation de gènes ou l'expression de protéines (par exemple, protéines fluorescentes rapportrices) de manière locale et aigüe chez la souris, *in utero* ou dans le cerveau postnatal, a l'avantage d'être rapide et de réduire le nombre de souris nécessaire par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes ou transgéniques. Cette approche est donc la méthode de choix quand nous testons la fonction de nouveaux gènes de pathologies humaines. Des travaux précédents, nous ont permis de valider ces techniques et donc de minimiser le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique la condition mutante à la condition contrôle. Grâce à cette méthode nous éclaircirons les voies biochimiques et mécanismes subcellulaires essentielles pour le développement cortical. L'étude de mécanismes physiopathologiques liés aux déficits des différents gènes d'intérêt, et réalisée par les approches ci-dessus, est nécessaire à la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques.

- Raffiner : Nos activités impliquent toujours une attention particulière sur le soin et le bien-être de l'animal. Les souris sont hébergées dans un milieu enrichi et des observations du bien-être sont réalisées 1 fois/jour. Les souriceaux et jeunes animaux sont surveillés, afin de s'assurer que la mère s'occupe bien d'eux. Pendant toutes nos expériences, nous prenons toutes les précautions nécessaires afin d'éviter toute douleur, en utilisant des pratiques adaptées. Les interventions chirurgicales, réalisées

sous anesthésie et en présence d'analgésiques, soulèvent une attention post-chirurgicale particulière (surveillance et traitement des plaies). En cas de comportements anormaux (manque de toilette, manque d'intérêt pour la nourriture), l'état des animaux est surveillé plusieurs fois par jour. Afin d'éviter une souffrance de la souris, les animaux sont anesthésiés et euthanasiés conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Le projet impliquera l'utilisation de 1038 animaux et embryons pour l'étude d'immunohistochimies et pour des approches par électroporation *in utero*, réalisées afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire à l'étude.

16957 L'inflammation chronique de l'intestin (ICI) est une pathologie qui regroupe plusieurs maladies, notamment, la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn. Elles sont caractérisées par une inflammation de la paroi intestinale. L'ICI touche principalement le côlon mais il est possible de voir des formes où toutes les parties de l'intestin sont touchées. Cliniquement, l'ICI est une pathologie très invalidante pour les patients qui peut se traduire cliniquement par un ou plusieurs symptômes tels que des douleurs abdominales, des diarrhées parfois sanglantes, une perte de poids, une atteinte de la région anale (fissure, abcès)

L'origine de ces maladies reste inconnue. Plusieurs études ont associé la survenue de ces pathologies à des facteurs génétiques mais certaines habitudes alimentaires peuvent aussi accélérer la survenue de ces pathologies ou aggraver leurs poussées symptomatologiques tel que le tabac (dans la maladie de Crohn) et la consommation d'alcool.

De nos jours, il n'existe aucun traitement curatif de ces maladies. Les médicaments utilisés permettent de contrôler durablement la maladie en dehors des poussées. La plupart des traitements existants sont basés sur l'administration de médicaments atténuant ou diminuant les symptômes afin d'améliorer la qualité de vie des patients en prolongeant les phases de rémission. L'un des principes actifs les plus prescrits lors des épisodes de rectocolite hémorragique sont les dérivés aminosalicylés (5-ASA). Ces derniers sont en revanche inefficaces dans la maladie de Crohn. De leurs côtés, les corticoïdes sont de moins en moins prescrits du fait de leurs nombreux effets indésirables. Lorsque la maladie est évolutive, la stratégie thérapeutique généralement adoptée vise à réguler l'immunité des patients en administrant des immunomodulateurs qui bloquent spécifiquement les facteurs de l'inflammation impliqués dans la maladie. Dans les cas les plus graves où les patients ne répondent pas aux différents traitements, le recours à la chirurgie est envisagé bien que le succès de cette dernière ne soit pas assuré notamment dans la maladie de Crohn qui est caractérisée par une inflammation dans différents segments de l'intestin.

De gros efforts en recherche biomédicale sont déployés pour trouver un traitement curatif pour les patients souffrants des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Dans ce contexte, notre groupe s'intéresse à l'activité antiinflammatoire intrinsèque de certains glycosaminoglycanes (GAGs) notamment l'acide hyaluronique (AH).

Des études cliniques et précliniques ont démontré l'efficacité thérapeutique de l'AH dans le traitement des ICI mais le temps de résidence de l'AH administré par voie orale n'est pas optimal et sa durée d'attachement à la paroi intestinale est sujette à amélioration. Le but de ce projet est de jouer sur la forme des nanoparticules d'AH pour améliorer ces paramètres. Des études ont montré que la forme du système nanoparticulaire joue un rôle sur le devenir *in vivo* du médicament. Des modèles mathématiques ont prouvé que la probabilité d'adhésion ainsi que la mobilité des nanoparticules non sphériques est différente de celles des objets sphériques.

L'AH sera formulé sous forme de plaquettes (nanoparticules non sphériques et aplaties), ce qui devrait favoriser le contact et l'adhésion avec la muqueuse intestinale.

Nos études de pharmacocinétiques *in vivo* et *ex vivo* sur animal sain ont montré clairement une meilleure accumulation de nos nanoparticules non sphériques et aplaties dans les différents segments de l'intestin et notamment dans le côlon. Pour compléter et arriver à l'objectif final de notre projet, nous souhaitons tester leur efficacité thérapeutique dans un modèle animal d'inflammation de l'intestin.

L'utilisation de nanoparticules fluorescentes nous permettra d'étudier l'accumulation et la distribution de nos nanomédicaments tout au long du tractus gastro-intestinale grâce à l'imagerie. L'efficacité

thérapeutique sera évaluée par des analyses macroscopiques et histologiques des tissus intestinaux notamment du gros intestin.

Le passage à un modèle animal pour l'étude d'efficacité est incontournable car la cascade inflammatoire induite dans ce type de modèle est difficilement reproductible *in vitro*. Les nanomédicaments, administrés par voie orale, vont traverser le tractus gastro-intestinal et il est nécessaire de prendre en compte différents facteurs primordiaux qui auront un impact sur leur absorption tels que la dilution par les fluides gastriques et intestinaux, la présence de mucus qui se renouvelle de façon permanente, paramètres qui ne sont pas modélisables *in vitro*.

Une planification statistique minutieuse permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Pour la réalisation de ce projet, nous utiliserons 70 rats.

Les animaux seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi afin de favoriser leur bien-être. Les méthodes utilisées seront appropriées pour réduire le plus possible le stress que pourraient ressentir les animaux. Des méthodes d'anesthésie et des analgésiques seront utilisés le cas échéant pour exécuter toute intervention douloureuse.

16958 Les lamproies marines sont des poissons migrateurs potamotiques qui remontent les fleuves Français depuis l'océan tous les ans au printemps pour se reproduire en amont des rivières, comme le saumon atlantique.

La rivière étudiée accueille ainsi l'une des plus grande population Européenne de lamproies marines. Des signaux inquiétants sur l'état des stocks dans cette rivière apparaissent néanmoins depuis une dizaine d'année.

Une activité de pêche professionnelle à la lamproie existe sur cette rivière. Elle est aujourd'hui considérée par certains comme une des responsables de la diminution des stocks. Aucune donnée sur les taux d'exploitations de la filière n'est cependant aujourd'hui disponible.

Des comptages de lamproies en migration sont également effectués dans certaines passes à poissons en amont du cours d'eau, sans savoir quel ratio de la population totale s'engageant sur le bassin depuis l'océan, représente ces contingents comptabilisés en amont.

Afin d'apporter des éléments de réponses, notre structure à proposée une étude de Capture/Marquage/Recapture de lamproies dans le cours d'eau, afin d'étudier d'une part le taux d'exploitation par les pêcheurs professionnels et d'autre part, la proportion de lamproies marquées comptabilisées dans les passe à poissons en amont.

Notre étude a été retenue dans le cadre d'un appel à projet interrégional, en collaboration avec différentes structures de recherches et de gestion du milieu aquatique et des populations de poissons migrateurs et soutenue par des fond Européens.

Notre projet consiste donc à marquer 1 000 lamproies marines en aval du cours d'eau au cours de la migration 2021 entre janvier et juin, avec des petites marques RFID passives de type PIT-Tag.

Les lamproies recapturées plus en amont lors de leur migration par les pêcheurs professionnels seront détectées grâce à du matériel spécifique d'enregistrement mis à leur disposition lors de la relève de leur engin de pêche.

Les lamproies marines comptabilisées dans les passes à poissons plus en amont seront également détectées si elles ont été marquées, grâce à l'installation d'antennes de détections dans les passes.

Il sera ainsi possible de proposer des premières évaluations du taux d'exploitation afin d'apprécier l'impact de l'activité économique de pêche sur le stock de lamproies marines dans cette rivière.

Les indicateurs d'état des stocks à partir des lamproies comptabilisées dans les passes en amont seront également ainsi affinés et leurs fiabilités pourra être précisées grâce à ces résultats.

Ces résultats doivent permettre à terme de comparer l'impact de l'activité vis-à-vis d'autres facteurs de perturbation et si besoin, de proposer des mesures de gestions adaptés (mise en place de quota, de réserve de pêche...).

Nous avons pris soin de veillez au respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), principe fondamentale en termes d'Expérimentation Animal, dans la mise en place de notre protocole :

- Le Remplacement de notre modèle biologique (Lamproie marine - *Petromyzon marinus*) s'avère impossible dans la mesure où l'objectif du projet est l'étude du taux d'exploitation de cette espèce et que les techniques de pêches utilisées par les professionnels sont spécifiquement adaptés à la lamproie. De plus, le cycle biologique très particulier de la lamproie marine (grand migrateur potamotocque remontant les cours d'eau), rend impossible l'étude d'un autre modèle biologique de substitution sur le cours d'eau étudié.

- La Réduction du nombre d'animaux étudié a été optimisé grâce aux données d'estimation des stocks disponibles. Les gestionnaires du cours d'eau en question possèdent des outils de monitoring permettant de comptabiliser les lamproies marines dans certaines passes à poissons en amont du cours d'eau, au droit de certains barrages (comptage non exhaustifs ne prenant pas en compte la dispersion sur d'autres affluents ou les géniteurs ne remontant pas autant en amont). Grâce a ces suivis, une population de 50 000 à 100 000 lamproies marines remontant le cours d'eau depuis l'océan est estimée chaque année. Du côté de la filière pêche, on évalue les captures annuelles entre 10 000 et 20 000 lamproies. Ainsi, un ratio de lamproies marquées ne dépassant pas 1 à 2% de la population totale estimée semble acceptable et non excéssif ce qui conduit à ne pas analyser inutilement une proportion trop importante de la population. Cependant, ce ratio est également assez important pour permettre des recaptures par les pêcheurs professionnels puisque les effectifs marqués représenteront 10 à 20% des captures annuelles et permettront ainsi des analyses statistiques robustes (utilisation du test d'estimation groupée de PETERSEN en appliquant le logiciel dédié SPAS "Population Analysis Software Group").

- Le Raffinement de notre procédure est également un élément pris en compte afin de diminuer les contraintes et la douleur infligées aux lamproies. Avant marquage, les lamproies sont placées en bain anesthésiant en milieu obscur, de manière à réduire son stress et accéléré l'anesthésie. Il est en effet reconnu qu'un bac de stabilisation de couleur foncé permet de réduire l'agitation des poissons lors de la stabulation. L'anesthésie s'effectue à l'aide d'une huile essentielle très bien connu et couramment utilisée, avec un dosage optimal, expérimenté et maîtrisé par notre structure depuis plus de 20 ans. Dès l'anesthésie du poisson, ce dernier est pris en charge par un personnel compétent, formé, qui applique strictement un protocole de marquage utilisé et amélioré par différentes structures de gestion et de recherche depuis les années 1990. La lamproie est ensuite placée en bac de réveil et relâchée dès la reprise complète de son activité de nage (réveil complet). La remise à l'eau du poisson s'effectue après contrôle du gradient de température entre le bac de réveil et le milieu récepteur, afin d'éviter tout choc thermique. Des études similaires réalisées sur d'autres cours d'eau Français ont permis de confirmer le faible impact de ce type de marquage sur les lamproies, qui reprennent normalement leurs migrations suite à la remise à l'eau.

16959 Le syndrome de Rett (SR) a été décrit pour la première fois en 1966 par le pédiatre autrichien Andréas Rett. Il s'agit d'une sévère encéphalopathie d'origine génétique qui touche essentiellement les filles avec une prévalence d'environ 1/15 000 naissances. Il s'agit du syndrome entraînant le plus grand nombre de retards mentaux profonds chez les femmes. Les individus atteints présentent un développement normal in utero et pendant les 6 à 18 premiers mois après la naissance. Ce développement s'arrête par la suite avec une perte de certaines acquisitions comme le langage et la marche, suivie d'un arrêt brutal du développement du cerveau associé à un profond handicap mental. Les autres signes cliniques associés sont des troubles locomoteurs, une mauvaise régulation thermique, une mauvaise circulation sanguine et des problèmes respiratoires. Afin de progresser dans la compréhension de la physiopathologie du SR, plusieurs modèles animaux existent actuellement, notamment des souris mutantes pour le gène responsable du SR, MeCP2. Les signes cliniques présentés par ces souris sont très similaires à ceux rencontrés chez les patientes atteintes du SR.

Dans ces modèles animaux du SR, peu d'études se sont concentrées sur les atteintes du cervelet, une région impliquée dans le contrôle de la coordination motrice, ainsi que dans la régulation des émotions et des interactions sociales. Or, ces fonctions sont fortement dérégulées chez les personnes atteintes du SR et il est fort probable que la physiologie du cervelet soit altérée dans le SR.

Ce projet a pour objectif d'étudier les atteintes cérébelleuses dans un modèle souris mutant du SR, en combinant plusieurs stratégies complémentaires permettant une caractérisation anatomique, moléculaire (grâce, entre autres, des expériences de séquençage), fonctionnelle et comportementale.

Ce projet nous permettra d'avoir une vision plus complète de l'ensemble des dérégulations cérébelleuses induites par les mutations présentes chez les patientes atteintes de SR, permettant peut-être ainsi le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le nombre total d'animaux utilisés pour cette étude est de 760 souris sur 3 ans, dont 348 souris dans le cadre de procédures réglementaires. 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 les tests comportementaux, 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 (transgéniques positifs et négatifs) afin de limiter le nombre d'animaux générés sans être utilisés pour l'expérimentation. Le projet traitant de troubles neurologiques 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. 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. Enfin, les animaux sont surveillés étroitement pendant toute la durée des expériences pour éviter toute souffrance inutile, dans le cadre de la mise en place de points limites spécifiques et adaptés.

16960 Pour les animaux comme pour l'homme, l'alimentation permet d'assurer l'équilibre physiologique tant en termes de développement que de santé. Une fois ingérés, les acides aminés apportés par les protéines des aliments servent à la synthèse des protéines de l'organisme et de molécules à activité biologique ainsi qu'à la fourniture d'énergie. Afin de limiter la concurrence entre l'alimentation de l'homme et celle des animaux, notamment pour les sources de protéines, la valorisation de sources de protéines non valorisables pour l'alimentation humaine peut être une solution pour une alimentation durable. Toutefois, ces sources de protéines demandent à être étudiées pour déterminer si elles répondent aux besoins nutritionnels des animaux et leurs effets sur le métabolisme, la physiologie et la santé.

Une fois ingérée, une protéine va être digérée dans le tube digestif, ce processus aboutit à la libération de peptides et d'acides aminés constitutifs de la protéine de départ, qui seront absorbés et passeront dans le sang pour être utilisés par l'organisme. La digestion est un processus physiologique qui sollicite beaucoup le tube digestif et qui interagit avec le reste de l'organisme en envoyant des signaux métaboliques, hormonaux et nerveux. Les protéines alimentaires peuvent subir des traitements technologiques pour les rendre plus digestibles et plus facilement assimilables une fois ingérés. Les procédures technologiques, comme l'hydrolyse, prédigèrent les protéines pour libérer des peptides (petits fragments de protéines) et des acides aminés libres sans modifier la structure primaire de la protéine, c'est à dire la nature des acides aminés constitutifs de la protéine de départ. L'ingestion d'une protéine hydrolysée sollicitera beaucoup moins les processus digestifs et probablement les signaux métaboliques qui en découlent.

L'objectif de ce projet est d'étudier les effets métaboliques et physiologiques de l'ingestion d'une protéine de plumes de volailles intacte (1), partiellement (2) ou totalement (3) hydrolysée chez 30 porcs en croissance.

Dès le début de l'expérience, les porcs seront répartis 3 groupes expérimentaux de 10 porcs. Chaque groupe sera nourri avec un aliment ne contenant qu'une des 3 sources de protéine précédemment citées pendant toute la durée de l'expérience qui sera de 2 semaines. Les aliments expérimentaux seront formulés pour satisfaire les besoins nutritionnels des porcs, à l'exception des protéines.

Les effets métaboliques seront déterminés en analysant la vitesse d'apparition dans le sang de métabolites et d'hormones suite à l'ingestion d'un repas d'épreuve contenant l'une des 3 sources de

protéine. La procédure consiste à proposer au porc l'aliment sous forme d'un repas de petite taille et de réaliser une fois ce repas ingéré une cinétique de prélèvements de sang pendant 6 heures après le repas (environ 16 prélèvements de 4 ml de sang). Le sang prélevé permettra ensuite le dosage des acides aminés et d'autres métabolites et hormones.

Les effets physiologiques seront déterminés à l'aide de mesures faites sur les organes prélevés après l'euthanasie de porcs une semaine plus tard.

Ce projet est réalisé dans le respect des règles 3R:

Remplacement: des animaux vivants sont nécessaires car les effets mesurés résultent de processus biologiques dynamiques qui impliquent la digestion et le métabolisme qui ne peuvent pas être reproduits dans des modèles *in vitro*.

Réduction: le nombre d'animaux nécessaires (10 par traitement) est suffisant pour détecter les différences statistiques entre les régimes expérimentaux.

Raffinement : l'ensemble des procédures sera réalisé par du personnel expérimenté et en respectant des points limites afin de réduire la souffrance et la douleur des animaux. Les animaux seront suivis quotidiennement.

16961 Ce projet vise à produire des connaissances sur les liens entre santé mentale et santé physiologique chez le porc. Les effets de situations négatives ponctuelles ou de durée modérée sur la fonction immunitaire sont aujourd'hui bien connus. Par contre, l'impact de situations durables de bien-être ou de mal-être, associées à des états mentaux stables, a été moins exploré dans les espèces d'élevage. Or, chez ces derniers, la relative stabilité physique du milieu de vie et l'opportunité qu'il génère (ou non) d'exprimer durablement des comportements favorisant des émotions positives ou négatives peut affecter l'état affectif sur le long-terme.

Les installations expérimentales dans lesquelles se dérouleront ce projet comportent deux troupeaux de truies élevés en parallèle dans des environnements conventionnels pour l'un et enrichi pour l'autre (plus d'espace, litière de paille profonde). Des données antérieures nous permettent déjà d'affirmer que le bien-être des truies dans ces installations est meilleur dans le système enrichi en comparaison du système conventionnel, et que ces différences sont associées à une plus forte mortalité néonatale de la descendance dans le système conventionnel comparé au système paille. Le présent projet utilisera ce modèle pour mieux décrire les impacts de l'enrichissement du milieu de vie pendant de longues périodes de la vie des truies (chaque période de gestation) sur leur état mental, leur comportement et leur fonction immunitaire et sur l'immunité de leur progéniture. Il précisera les mécanismes cellulaires en jeu, en explorant l'épigénétique des cellules immunitaires.

L'étude se déroulera en deux répétitions identiques, impliquant chacune 14 truies (7 par système) et un porcelet par truie, soit 28 truies et 28 porcelets au total. Les truies, logées pendant leur gestation dans des salles sur paille avec une surface importante pour le système enrichi et sur caillebotis avec une surface plus faible (mais néanmoins supérieure à la surface minimale réglementaire) pour le système conventionnel, seront suivies pendant toute leur gestation et jusqu'au sevrage. Des mesures zootechniques (pesées, taille et poids de portée à la mise-bas et mortalité néonatale) et comportementales (relations sociales dans le groupe, répartition temporelle des activités comportementales au cours de la journée, réactivité émotionnelle) seront réalisées sur l'ensemble de ces truies. Des prises de sang seront réalisées sur les truies vers 98 jours de gestation et 11 jours après la mise-bas (27 mL par truie et par jour de prélèvement), et sur un porcelet par portée vers 11 jours d'âge (16 mL par porcelet). Les mesures réalisées dans les échantillons sanguins seront des mesures de biologie moléculaire (transcriptome, épigénome) et de biologie cellulaire (remise en culture des cellules immunitaires sanguines et dosage de cytokines), permettant de décrire les effets de l'environnement de vie des mères gestantes sur les cellules immunitaires de ces dernières et de leurs petits. Nous observerons les différentiels d'expression de gènes dans les cellules immunitaires sanguines et nous déterminerons si ces différences sont associées à la présence de marques épigénétiques dans l'ADN de ces cellules.

La règle des 3R a été prise en compte :

-remplacer : le projet concernant spécifiquement l'espèce porcine, son utilisation ne peut être remplacée

-réduire : nous avons réduit les effectifs de truies exposées au prélèvement de sang au minimum nous permettant de traiter les données avec des statistiques paramétriques (7 individus par répétition et par lot, soit 14 truies par lot expérimental au final). Pour décrire l'effet sur la descendance, nous avons choisi de n'étudier qu'un seul porcelet par portée, alors que les truies en produisent environ 15 par mise-bas.

-raffiner : l'objectif de ce projet était de comparer des milieux de vie susceptibles de générer sur le long terme des états mentaux différents chez les truies et d'en étudier les répercussions immunitaires. Pour cela, ce projet ne génère pas de souffrance animale liés au mode de logement car il s'appuie au contraire sur un dispositif préexistant proposant des conditions de vies standard et des conditions enrichies (donc pas de groupe "stressé" mais au contraire un groupe en meilleur état de bien être que le groupe témoin). Le fait de limiter les mesures aux cellules immunitaires sanguines, et donc de réaliser toutes nos mesures immunitaires sans avoir à abattre d'animaux pour collecter les cellules dans d'autres organes lymphoïdes est également une forme de raffinement du protocole, qui permet de maintenir en vie tous les animaux enrôlés dans le protocole. Enfin, nous avons choisi de limiter le nombre de prises de sang à deux sur la mère, et à un unique prélèvement sur les porcelets (donc pas d'étude cinétique possible), pour limiter le nombre d'événements stressants pour chacun des animaux expérimentaux.

16962 La maladie de Parkinson (MP) est due à une mort progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNc), une structure cérébrale qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la motricité. De nombreuses preuves indiquent que cette neurodégénérescence serait due à une accumulation anormale de la protéine alpha-synucléine dans les neurones de la SNc. De fait, les stratégies thérapeutiques visant à bloquer ce phénomène apparaissent comme particulièrement pertinentes dans le développement d'un traitement contre la MP. Cependant, ce type d'approche nécessite le développement de modèles animaux prédictifs qui reproduisent de façon plus fidèle la physiopathologie humaine. Ce projet repose sur l'utilisation de souris transgéniques exprimant la protéine alpha-synucléine humaine afin de permettre l'évaluation de candidats médicaments visant à atténuer l'expression de cette protéine. Au meilleur état des connaissances actuelles, ces souris ne présentent pas de phénotype délétère, et donc elles ne présentent aucun trouble moteur ou autre signe visible de la maladie de Parkinson.

Pour ce projet, il est prévu d'utiliser 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 étudier les effets d'un produit ciblant l'expression d'une protéine humaine sur un organisme dans sa globalité. A 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 : Le raffinement sera obtenu par la mise au point de procédures rigoureuses, un suivi quotidien de l'état de santé des animaux, le suivi des signes cliniques, la familiarisation des animaux aux procédures expérimentales et la détermination des points limites. Un protocole analgésique adapté pour la chirurgie et un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux avec des soins et un enrichissement adapté permettront une bonne récupération des animaux.

16963 Le cerveau antérieur, qui comprend le cortex cérébral et le striatum, est une région du cerveau qui nous permet de percevoir notre environnement, établir des réponses motrices adaptées et réaliser des tâches cognitives élaborées. Ces fonctions dépendent de l'activité de réseaux complexes de neurones, qui commencent à se mettre en place au cours du développement embryonnaire et postnatal. Pendant cette phase de câblage, l'activité neuronale précoce joue un rôle essentiel dans la mise en place des circuits fonctionnels. Comprendre le rôle de cette activité est d'autant plus important que des défauts

de développement sont associés à l'émergence de maladies neurodéveloppementales, telles que les troubles du spectre autistique et la schizophrénie. Dans ce contexte, nous nous intéressons aux cellules de Cajal-Retzius (CR), des neurones transitoires mais qui sont importants pour le développement cortical, et aux neurones de projection du striatum (SPN). Nos travaux, ainsi que ceux d'autres laboratoires, ont montré précédemment que ces populations neuronales sont régulées par un processus migratoire et par une mort développementale, qui semblent être régulés par l'activité neuronale. Dans ce projet, nous allons explorer le rôle de l'activité dans la migration et la survie des CR et des SPN, ainsi que les conséquences sur le développement du cortex cérébral et du striatum.

Notre laboratoire utilise le modèle de la souris car il permet les manipulations génétiques et les mécanismes de développement de son cerveau sont proches de celui de l'homme. La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale, notamment la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Les méthodes alternatives à l'utilisation du modèle murin sont malheureusement limitées pour répondre à nos questions scientifiques néanmoins, les manipulations *in vitro* seront utilisées à la place du modèle *in vivo* dès que la problématique le permet. De plus, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum nécessaire pour répondre à la question scientifique et les expériences réalisées seront optimisées dans la mesure du possible. L'inconfort des souris sera réduit au maximum grâce à l'utilisation d'anesthésique et d'analgésiques. En effet, les procédures sont bien établies et n'induisent ni douleur, ni angoisse ou stress. Les animaux sont manipulés par du personnel compétent et l'environnement enrichi. Enfin, il n'existe à l'heure actuelle pas de méthode alternative fiable à l'utilisation du modèle murin pour travailler sur la mise en place des circuits du cerveau antérieur mais nous resterons vigilants quant au développement de nouvelles méthodes.

Ce projet de recherche nécessitera environ 1341 animaux.

16964 Notre travail concerne le fonctionnement des plaquettes sanguines et plus particulièrement les voies de signalisation impliquant les ions calcium dont les variations de concentration traduisent des messages à travers les cellules et sont à l'origine des réponses cellulaires. Nous avons récemment montré que dans les plaquettes sanguines, il existait des réserves de calcium intracellulaire de différents natures. Ces réserves sont remplies par des pompes à calcium distinctes et le calcium est libéré par des seconds messagers différents. Nous avons particulier observé une libération de calcium précise qui permet une sécrétion d'ADP précoce qui est nécessaire pour obtenir une activation complète des plaquettes sanguines pour de faible stimulation. Lorsque que c'est voie de signalisation est bloquée, l'activation des plaquettes peut être réduite de près de 50%. Nous pensons que pouvoir contrôler ce mécanisme d'activation est particulièrement important pour le développement de nouveau médicament qui permettrait de réduire l'activité des plaquettes sans l'inhiber complètement, ce qui est aujourd'hui le cas avec les médicaments antiplaquettaires disponibles très efficaces et qui présentes des risques de saignement. En bloquant cette nouvelle voie de signalisation, il serait possible de diminuer la sensibilité des plaquettes tout en préservant leur intégrité autorisant une activation normale avec des doses fortes d'activateur.

Dans ce but, nous voulons, à travers ce projet, caractériser le (les) récepteur(s) de l'ADP impliqué(s) dans cette voie de signalisation spécifique. Les plaquettes expriment 2 récepteurs différents. Trouver un récepteur spécifique sensible au milieu extracellulaire permettrait de pouvoir réguler cette voie de signalisation plus facilement.

Cependant, l'existence de modèles murins n'exprimant pas de façon inductible soit l'un de ces récepteurs, soit l'autre, est particulièrement précieux car nous pourrions confirmer l'implication de ces protéines dans la voie de signalisation que nous venons de décrire, en réalisant des expériences similaires à celles que nous avons réalisées avec les plaquettes obtenues chez des animaux n'exprimant pas la pompe à calcium. L'utilisation de modèles murins est aujourd'hui indispensable car il n'est pas encore possible de pouvoir disposer de plaquettes sanguines produites *in vitro* pour réaliser ces études. Les plaquettes sont des cellules très fragiles dont la conservation est très faible et dont la production *in vitro* est encore très limitée. Pour caractériser la fonction plaquettaire, il faut utiliser des plaquettes isolées à partir de sang fraîchement prélevé. La voie de signalisation que nous étudions semblent être similaire entre les plaquettes de souris et les plaquettes humaines et nous prévoyons d'utiliser des plaquettes humaines quand cela est possible à l'aide d'inhibiteur plus ou moins spécifique.

Les animaux seront utilisés soit pour obtenir le sang nécessaire pour l'isolation des plaquettes pour la réalisation des expériences *in vitro* sur plaquettes lavées, soit pour la réalisation d'expérience de thrombose *in vivo* (procédure 2) permettant d'évaluer la fonction plaquettaire en condition *in vivo*. Il s'agit dans tous les cas de procédures réalisées sur des animaux anesthésiés et sans réveil. L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 535 animaux.

Afin de répondre à la règle des 3 Rs, les animaux sont élevés dans 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 la nidification), la souffrance sera limitée par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. L'ensemble des expériences sera effectué par une personne habilitée à expérimenter sur animaux. Enfin le nombre d'animaux nécessaire à l'ensemble de l'étude a été défini pour chaque procédure de façon à avoir une réponse statiquement analysable tout en limitant l'importance par la réalisation de plusieurs procédures en parallèle quand cela est possible.

16965 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 tester différents peptides spécifiques du SARS-Cov-2 capables d'activer une réponse humorale et ou cellulaire et analyser les effets engendrés par cette activation, c'est à dire si l'immunisation induit des anticorps neutralisants ou facilitants et ou une réponse cellulaire spécifique 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 différentes souches de souris ; la Balb/c et la souris Swiss (SW), ainsi que la C57BL/6 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 1520 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.

Cette nouvelle version de la saisine est un amendement afin d'ajouter des souches de souris permettant de déterminer si les peptides immunogènes induisent une réponse immunitaire satisfaisante dans différentes souches de souris présentant différents HLA.

Cette nouvelle version est en complément des tests réalisés sur les souris SWISS et BALB/c, nous souhaitons ajouter 180 souris, en sachant qu'il n'a été utilisé pour le moment que 100 souris. En effet, après utilisations des souris SWISS et BALB/C, nos premiers tests n'ont pas donné satisfaction. Nous souhaiterions continuer nos tests afin de déterminer si une meilleure immunisation des souris C57BL/6 pourrait être possible. Pour cela nous souhaitons tester nos immunisations sur la C57BL6F1-Tg (HLA-A*0201/H2-Kb) A*0201, la C57BL6F1-Tg (HLA-A11), la C57BL6F1-Tg (HLA-B7), la C57BL6F1-Tg (HLA-A1), la C57BL6F1-Tg (HLA-A44), la C57BL6F1-Tg (HLA-B24), la C57BL/6N et la C57BL/6jRJ.

Nous souhaiterions utiliser 60 souris C57BL/6 (N et jRJ) et 120 souris pour le reste des souris C57BL/6 HLA (n = 20 par groupe).

Nous souhaiterions reproduire la même procédure décrite dans la saisine avec quelques modifications présentées ci-après.

16966 Le projet : La fibrose hépatique est la conséquence de toutes les maladies chroniques du foie. Elle est caractérisée par une synthèse accrue et un dépôt de matrice extracellulaire (MEC) de composition altérée, et elle aboutit inéluctablement à la cirrhose en l'absence de traitement de la cause, voire au carcinome hépatocellulaire.

Les myofibroblastes, acteurs majeurs de la fibrogenèse, synthétisent la MEC pathologique. Ces cellules sont absentes du foie sain. Si les cellules étoilées du foie (CEF) ont longtemps été considérées comme la principale source de ces myofibroblastes, l'implication des myofibroblastes portaux (MFP) dans la fibrose est maintenant clairement démontrée. Le but de notre étude est de mieux caractériser le rôle des MFP et de leur précurseur (PMP) dans la progression de la fibrose hépatique.

Une étude de l'expression des gènes nous a permis d'identifier différents marqueurs spécifiques des PMP, permettant de les discriminer par rapport à toutes les autres cellules du foie. Parmi ces marqueurs, nous nous focaliserons particulièrement sur Gli1.

Dans cette étude, nous utiliserons différents protocoles d'atteinte hépatique dans des souris C57BL/6J sauvages et dans 2 modèles de souris transgéniques : 1) des souris exprimant un traceur fluorescent spécifiquement dans les PMP Gli1+, qui nous permettront de suivre le devenir de ces cellules au cours de la régénération tissulaire et de la fibrose hépatique, et 2) des souris dont les cellules Gli1+ peuvent être délétées, qui seront soumises aux mêmes protocoles afin de déterminer précisément la contribution des PMP à la réparation tissulaire hépatique.

Les animaux :

* Type : 2 modèles de souris génétiquement modifiées seront nécessaires dans le cadre de ce projet : le premier exprimant un traceur fluorescent spécifiquement dans les PMP Gli1+ et le second permettant la délétion des cellules Gli1+. Des souris C57BL/6J (modèle commercial) seront également utilisées.

* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 1548 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 étudier les fonctions des cellules qui font l'objet 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 dans les pathologies hépatiques, telle que la cholestase qui évolue inéluctablement vers la fibrose et ensuite la cirrhose.

* 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 a été mis 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.).

16967 La polyarthrite rhumatoïde (PR) et le psoriasis sont des maladies chroniques, inflammatoires. Ces pathologies entraînent douleurs et handicaps. Les causes sont inconnues ; certains facteurs génétiques, certains facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer une PR) ou l'existence d'autres pathologies, sont autant de terrains favorables pour l'installation de ces maladies. Ainsi, l'arthrite psoriasique est une pathologie au cours de laquelle les patients accumulent inflammation de la peau et des articulations. La PR est une maladie qui réduit non seulement la qualité de vie, mais également l'espérance de vie du fait de complications cardiovasculaires. Son coût est élevé pour la société.

Le développement de ces maladies peut se diviser en plusieurs phases : une phase d'initiation pendant laquelle les signes cliniques de la maladie sont invisibles, une phase chronique pendant laquelle le mécanisme inflammatoire s'installe, et une phase aiguë où chaque poussée augmente considérablement la destruction tissulaire.

Les traitements actuels ne peuvent permettre une rémission que d'une minorité de patients, et peuvent améliorer le quotidien chez d'autres, cependant, il ne faut pas mettre de côté les patients chez qui ces traitements ne sont que transitoirement efficaces voire totalement inefficaces. De plus, même si les biothérapies ont fortement amélioré le devenir des patients, elles sont extrêmement coûteuses. L'une des cibles thérapeutiques majeures dans ces maladies inflammatoires est le TNF-alpha (« Tumor Necrosis Factor-alpha ») dont les mécanismes d'action n'ont pas encore été totalement élucidés, ce qui pourrait expliquer certains échecs dans cette stratégie. Pour toutes ces raisons, il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous devons pour cela mieux comprendre les mécanismes d'initiation et de maintien de la maladie tout au long de la vie d'un patient afin d'identifier les meilleures cibles. En particulier, trois protéines, le récepteur de type Toll 9 (TLR9), la protéine C1q du système du complément ainsi que la cytokine interféron (IFN)-alpha, pourraient intervenir à différents stades de ces mécanismes et il est nécessaire de mieux définir leurs rôles. Les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans le développement de la PR et du psoriasis. Or le TLR9 et le C1q sont activés par certains de ces facteurs, ce qui peut conduire à une modulation de l'expression de l'IFN-alpha. De plus, des ligands endogènes libérés au cours de ces deux maladies sont également susceptibles d'activer le TLR9 et le C1q, et ainsi

moduler l'expression de l'IFN-alpha. Cependant, l'IFN-alpha a des activités différentes selon le contexte et il pourrait avoir des rôles opposés selon le stade de développement de ces maladies. Nous étudierons également les rapports entre les cellules de l'immunité innée et une thérapie de la polyarthrite rhumatoïde, le tofacitinib, dont l'action sur ces cellules est encore mal comprise. A l'inverse, les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont impliqués dans le contrôle des réponses immunitaires. Néanmoins leurs fonctions sont altérées dans la PR et le psoriasis. Cependant, ces fonctions pourraient être en partie rétablies sous l'effet de l'IFN-alpha et c'est pourquoi nous testerons dans nos modèles l'activité thérapeutique de Treg exposés à l'IFN-alpha.

Les mécanismes que nous souhaitons étudier demandent d'avoir un système immunitaire complet et proche de celui de l'homme. L'utilisation de la souris est donc tout indiquée dans cette étude et ne peut être remplacée, mais se fera en accord avec la règle des 3R. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, le nombre de souris nécessaires dans chaque procédure a été défini sur la base des études réalisées historiquement dans le laboratoire. Sur les animaux seront prélevés de nombreux tissus afin d'obtenir un maximum d'information et limiter ainsi la répétition d'expériences. Dans la mesure du possible, une anesthésie adaptée sera privilégiée pour la réalisation de gestes techniques et l'enrichissement des cages par du coton et des igloos sera effectué. Des points limites destinés à éviter toute souffrance inutile des souris seront mis en place dans chaque expérience et tous les animaux seront pesés et leur comportement surveillé afin de veiller à leur bien-être. Ce projet de recherche nécessitera l'utilisation de 2517 souris au maximum, sur 5 ans.

16968 Le rumen est un compartiment digestif comportant un important écosystème microbien qui donne aux ruminants une capacité remarquable de digérer les fibres végétales et d'en retirer une grande partie de leurs nutriments. Cet écosystème est dépendant des conditions physiques du milieu, et notamment du pH qui peut modifier les équilibres des populations et les métabolismes microbiens. Les réactions métaboliques microbiennes ont aussi pour effet de modifier les conditions de milieu. Chez les vaches laitières, une maladie métabolique commune est l'acidose ruminale qui consiste en un dérèglement des conditions fermentaires dans le rumen et en particulier en une baisse du pH suite à une production d'acide lactique. Les conséquences pour l'animal sont, à court terme, des baisses d'ingestion plus ou moins régulières et à long terme, une perturbation du fonctionnement du rumen, voire même des lésions sous forme de kératinisation de la paroi ruminale. Le risque d'acidose est réputé commun en élevage car les besoins nutritionnels des vaches laitières peuvent être difficiles à couvrir en début de lactation sans avoir recours à des concentrés susceptibles de fermenter rapidement dans le rumen. D'autre part, un déséquilibre des apports protéiques peut induire au niveau du rumen une production excessive d'ammoniaque susceptible d'être facilement excrété dans l'urine, conduisant à une perte d'azote dans l'environnement évitable dans un contexte de lutte contre les phénomènes d'eutrophisation. Pour cette raison le suivi des paramètres pH et teneurs en ammoniaque du rumen est important pour optimiser des rations alimentaires de vaches laitières tant d'un point santé des animaux qu'environnemental, d'autant plus dans un contexte où les anciens concepts d'alimentation doivent sans cesse être renouvelés du fait de l'apparition de nouvelles ressources alimentaires. L'objectif de ce projet est d'évaluer des méthodes de mesures de ces paramètres toujours moins invasives pour les vaches laitières. Il s'agira notamment d'évaluer si un système télémétrique de mesure du pH et des teneurs en ammoniaque du rumen peut produire des mesures fiables si on les compare à des mesures sur pailleuse utilisant des capteurs vérifiables et ré-étalonnables à volonté (pour le pH) ou des dosages colorimétriques (pour le NH₃). Il s'agira aussi d'évaluer si des sondages ponctuels par voie buccale peuvent permettre d'échantillonner de façon représentative le contenu du rumen.

Ce projet respecte la règle des 3R.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour définir si la ration alimentaire est susceptible de modifier le pH et les teneurs en ammoniaque du rumen car ce dernier résulte de l'équilibre entre l'absorption des acides gras volatils par la paroi ruminale et leur production par les fermentations.

Réduire : Le nombre d'animaux impliqué est réduit à 6 avec un schéma expérimental dans lequel chaque animal constituera son propre témoin ce qui permet de réduire de façon importante le nombre d'animaux.

Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse du bien-être des animaux. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe d'acidose et les traiter. Par ailleurs, cet essai a pour objectif de raffiner la mesure du pH et de l'ammoniaque ruminal dans de futurs essais.

16969 Les maladies auto-immunes, comme par exemple la sclérose en plaques, le diabète type 1, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus... touchent 5% de la population et sont incurables pour la plupart. Les traitements disponibles actuellement, comme les corticoïdes ou les immunosuppresseurs, n'ont qu'un effet partiel et provoquent souvent des effets secondaires graves. Du fait de la complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces maladies, nous devons avoir recours à l'animal pour mieux comprendre ces mécanismes et tester de nouvelles approches thérapeutiques.

Notre équipe travaille depuis longtemps sur un type de lymphocytes T, dit lymphocytes T régulateurs (Treg), qui sont des cellules du système immunitaire qui jouent un rôle central dans la prévention de ces maladies auto-immunes. Un des objectifs principaux des projets développés dans l'équipe consiste à mieux comprendre la biologie des Treg et à étudier le rôle de ces Treg dans la sclérose en plaques avec le modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et de colite auto-immune. Ce travail nous permettra de mieux connaître la physiopathologie complexe de ces maladies et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à moduler la quantité et/ou la qualité de ces cellules pour prévenir ou contrôler le développement de ces maladies.

Nous allons travailler sur le rôle joué par certaines molécules de co-stimulation comme le TNFR2, 4.1BB et ICOS qui sont fortement exprimés par les Treg, notamment dans les tissus enflammés. Nous travaillerons également sur certaines molécules impliquées dans la régulation du métabolisme des Treg, notamment mTOR, AMPK et LKB1 du fait de la modification de l'environnement métabolique dans les tissus enflammés. Pour ce faire, nous avons développé au laboratoire des souris génétiquement modifiées dans lesquelles l'expression de ces différentes molécules est éliminée dans les seuls Treg par la technique des souris dites Cre-lox ou KO conditionnelles. Mieux comprendre le rôle de ces molécules dans la biologie des Treg à l'homéostasie et en situation inflammatoire permettra de mieux comprendre la physiopathologie des maladies auto-immunes. De plus, le ciblage de certaines de ces molécules dans les Treg pourrait amener à de nouveaux traitements de ces maladies. C'est l'objectif général de ce projet. Grâce à ce travail, nous espérons avoir une meilleure connaissance de la physiopathologie des maladies auto-immunes, de la sclérose en plaques et de la colite en particulier, notamment concernant la régulation de ces maladies par les Treg dans les sites enflammés. Nous espérons également pouvoir proposer de nouvelles approches thérapeutiques dans cette pathologie consistant à stimuler les Treg dans le système nerveux central.

Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R. Parfois nous utilisons des lignées cellulaires transformées et de l'expérimentation *in vitro* pour remplacer les études sur cellules primaires. Il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Les groupes d'études sont faits le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupes témoins. Et enfin nous cherchons à raffiner au maximum nos protocoles pour limiter la souffrance animale ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découdre. C'est pourquoi nous planifions les expériences et le milieu sera enrichi pour éviter le stress des souris, nous effectuerons une surveillance fréquente des animaux pour limiter la souffrance et nous procéderons à l'euthanasie des souris en cas d'attente des points de limite préétablis.

Considérant l'ensemble de ces procédures appliquées sur la diversité des protocoles expérimentaux, nous estimons une utilisation à hauteur de 1393 souris pour l'ensemble de ce programme de recherche qui va se dérouler sur les 5 prochaines années.

16970 Le cancer du côlon (CC) est la troisième cause maligne diagnostiquée et la quatrième cause de décès par cancer dans le monde. Jusqu'à récemment, le CC semblait être une maladie homogène. Néanmoins, la caractérisation moléculaire de CC au cours de la dernière décennie a permis de scinder cette maladie apparemment homogène en plusieurs entités. Il a été décrit que la moitié des CC appartiennent à plusieurs sous-types moléculaires (CC « mixtes »). Il est important de noter que le

pronostic des cas mixtes semble être dicté par le sous-type moléculaire de plus mauvais pronostic qui sous-tendent l'importance de ces phénotypes mélangés dans l'évolution du cancer.

Nous aimerions aborder, dans le cadre de ce projet, la question de savoir comment les adénocarcinomes colorectaux humains présentant un phénotype « mixte » évoluent *in vivo*, dans un modèle orthotopique de souris approprié. Ce modèle va nous permettre de reproduire le plus fidèlement possible les mécanismes intervenant en cette pathologie. En greffant les cellules cancéreuses sur un site correspondant à celui de la tumeur d'origine, nous pouvons étudier l'implication microenvironnement et la capacité métastatique des différents sous-types moléculaires du CC. Ce projet devrait avoir des implications majeures pour la stratification des patients et le développement de stratégies thérapeutiques bien fondées, y compris de traitements de deuxième ligne.

Ce projet d'une durée de 5 ans prévoit des expériences de croissances tumorales dans des souris immunodéficiences. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Ce projet nécessite l'implication d'animaux vivants car il est essentiel pour l'étude du microenvironnement dans le développement tumoral et l'apparition de métastases. Nous avons choisi le modèle souris car la souris est le mammifère le plus utilisé en expérimentation animale (suffisamment petit pour en avoir un certain nombre, facile à manipuler et suffisamment grand pour pouvoir recevoir des injections de cellules tumorales). Le nombre d'animaux par groupe (15) est un compromis entre réduction et nombre d'animaux suffisants pour obtenir des résultats significatifs étant donné la complexité de chaque modèle. Le nombre de groupes proposés inclut les groupes contrôles nécessaires. Les expérimentations seront par ailleurs regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Les procédures utilisées dans ce projet sont basées sur des méthodes publiées précédemment, ce qui nous permet de réduire le nombre d'animaux qui seraient nécessaires pour optimiser la technique. Ce projet nécessitera au maximum 1620 souris (3 répétitions des expériences avec 540 souris chacune). L'étude est divisée en plusieurs procédures et sera arrêtée si une des procédures invalide l'hypothèse de travail ; le nombre de souris sera ainsi diminué. Par ailleurs, une veille bibliographique constante sera faite pour éviter toute manipulation déjà rapportée dans la littérature. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. 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. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés dans le respect de leur bien-être (maximum 5 souris par cage) et disposeront de coton dans les cages. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux seront anesthésiés pour minimiser ses mouvements afin d'effectuer la chirurgie le plus rapidement possible. Des analgésiques seront injectés avant et après la chirurgie pour supprimer la douleur et éviter la souffrance des animaux. Si les souris semblent faibles, de la nourriture et de l'eau seront ajoutées dans la cage pour leur faciliter l'accès ainsi que du coton pour les réchauffer. La surveillance régulière permettra le suivi du comportement (prostration, autoagression, etc) et de la croissance tumorale, afin d'euthanasier les animaux dès qu'ils atteignent un point limite.

16971 Les gliomes et en particulier les glioblastomes sont les cancers cérébraux les plus fréquents et les plus graves chez l'adulte. Le pronostic des patients est le plus souvent réservé malgré des traitements lourds (i.e. chirurgie, radiothérapie et, chimiothérapie cytotoxique). De nouveaux traitements sont donc nécessaires. Compte tenu du nombre de traitements innovants actuellement en développement dans les laboratoires académiques et industriels, ces derniers ne pourront pas tous être évalués rapidement dans le cadre d'essais cliniques chez l'Homme.

Il apparaît donc important d'accélérer l'évaluation et la hiérarchisation de ces traitements innovants prometteurs, en laboratoire, pour en faire bénéficier, dans le cadre d'essais cliniques, les patients souffrant de tumeur cérébrale maligne.

Pour sélectionner les molécules les plus efficaces le plus rapidement possible l'équipe développe et caractérise des lignées cellulaires de glioblastome dérivé de patient (PDCL) *in vitro* et des modèles murins de glioblastome (xénogreffes hétéro ou orthotopiques de PDCL dans des modèles murins).

Les modèles animaux xénogreffés avec des cellules de tumeurs cérébrales humaines sont des modèles appropriés complétant de manière pertinente les modèles cellulaires *in vitro* pour sélectionner

les traitements innovants les plus prometteurs. En effet, les modèles murins permettent d'étudier l'efficacité des traitements innovants sur des cellules tumorales cérébrales placées dans un micro/macroenvironnement (sous-cutané ou cérébral) récapitulant au plus près celui observé chez l'Homme. Cet environnement (i.e. système vasculaire, système immunitaire, barrière hématoencéphalique) joue un rôle clé dans le développement des cellules tumorales et n'est pas parfaitement modélisable *in vitro*.

Les efforts fournis afin de remplacer, réduire et raffiner sont :

1) Remplacer : Seuls les composés efficaces sur les PDCL *in vitro* par rapport aux traitements standards, seront testés *in vivo*.

2) Réduire : Les cellules tumorales cérébrales greffées chez l'animal sont transduites par le gène de la luciférase permettant de suivre le développement tumoral, cela évite le sacrifice séquentiel d'animaux et réduit donc le nombre d'animaux utilisé

Une étude statistique détermine le nombre d'animaux nécessaire minimum pour atteindre un niveau de significativité acceptable. Cela permet de limiter le nombre d'animaux et d'éviter les études ne permettant pas de répondre à une question posée par manque de puissance statistique,

3) Raffiner : La bioluminescence permet également de suivre l'efficacité des traitements testés en temps réel ce qui apporte une information supplémentaire à la survie.

Les animaux sont suivis quotidiennement et des points limites sont mis en place pour éviter au maximum la souffrance subie.

Des analgésiques adaptés sont utilisés dès qu'une chirurgie est effectuée (en pré et post opératoire) pour réduire l'inconfort, la douleur et le stress.

Les animaux utilisés dans le cadre de ce projet seront pour la majorité immunodéprimés (Souris athymics ou SCID) car cela est nécessaire pour permettre la greffe de PDCL humaines. Ils peuvent également être immunocompétents (souris C57BL/6) dans le cas d'étude de molécules ayant un effet sur l'immunité, les lignées cellulaires tumorales utilisées dans ce cas seront donc murines.

Le nombre d'animaux prévu pour les 5 ans de ce projet est d'au maximum 105 souris.

16972 Les thémothérapies regroupent un ensemble de méthodes basées sur l'utilisation de l'hyperthermie (dépôt de chaleur) locale à des fins thérapeutiques incluant le traitement des cancers. La possibilité de délivrer localement une dose prédéterminée d'énergie thermique aux tissus cancéreux permet aussi d'envisager, localement et de façon contrôlée, l'expression d'un gène thérapeutique (gène médicament, gène suicide). L'objectif de ce projet est de montrer la faisabilité de cette approche. Dans le projet le gène thérapeutique exprimé après le dépôt de chaleur sera remplacé par un gène d'imagerie, nous permettant ainsi de vérifier l'efficacité de notre approche par imagerie. Le dépôt de chaleur sera réalisé par 2 méthodes : utilisation de nanoparticules qui s'échauffent lorsqu'elles sont dans un champ magnétique ou l'application d'ultrasons focalisés en un point. Nous disposons de souris transgéniques qui sont sensibles à la chaleur, c'est-à-dire qu'elles expriment le gène d'imagerie lorsqu'on applique une hyperthermie. Nous utiliserons également des cellules de cancer de la prostate génétiquement modifiées. Ces cellules seront injectées aux souris en sous cutané ou dans la prostate, sans présenter de phénotype dommageable, pour générer des tumeurs. Afin de suivre la pousse des tumeurs et pour valider notre approche nous utiliserons des techniques d'imagerie optique. Ces méthodes d'imagerie nous permettent d'effectuer un suivi dans le temps sur un même animal.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est de 198 souris : 30 souris transgéniques (5 lots de 6 souris), 108 modèles sous cutanés (18 lots de 6 souris) et 60 modèles de tumeur dans la prostate (10 lots de 6 souris).

Remplacement, réduction, raffinement : La physiologie animale est difficile à reproduire ce qui rend l'utilisation des animaux indispensable. De plus il est difficile de reproduire les mécanismes complexes liés aux tumeurs. Avant d'être injectées aux souris, les nanoparticules seront testées sur des cellules en culture pour leur efficacité et leur absence de toxicité. Le modèle de tumeurs sous cutanées est un modèle facile à mettre en œuvre permettant de tester plusieurs conditions sur un même animal, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés au final. L'utilisation de l'imagerie optique permet de

réaliser un suivi dans le temps sur un même animal car c'est une technique non invasive. Les animaux sont surveillés quotidiennement par le personnel de l'animalerie et/ou l'expérimentateur. Ils sont hébergés dans le respect de leur bien être avec un enrichissement du milieu fourni par l'animalerie. Lors d'un acte chirurgical, la gestion de la douleur est prise en compte par l'administration d'analgésiques. Au moindre signe de souffrance de l'animal, l'expérimentation est arrêtée.

16973 Les événements climatiques extrêmes, tels que les vagues de chaleurs, contribuent à augmenter les activités de loisirs sur le littoral et, de ce fait, sont enclin à accroître les crèmes solaires (et autres produits cosmétiques) libérés dans le milieu. En tant que composé de ces crèmes solaires, les filtres UVs sont considérés comme contaminants pour les écosystèmes aquatiques. En parallèle de la contamination aux filtres UV, les vagues de chaleurs provoquent des augmentations drastiques de la température de l'eau. Cependant, aucune étude ne concerne les effets combinés de ces 2 facteurs (contamination aux filtres UV et augmentation de température) sur les organismes marins. Dans ce contexte nous proposons de démontrer la relation entre épisodes de chaleurs, activités récréatives côtières et utilisation des filtres UV contenus dans les crèmes solaires et aussi d'évaluer l'impact de la contamination aux filtres UV et de l'augmentation de température de l'eau sur le métabolisme et le comportement du mulot doré (*Liza aurata*). Enfin les réponses comportementales pertinentes pourront être utilisées sur les sites contaminés afin d'indiquer une dégradation de la qualité de l'eau.

En plus de permettre des avancées dans la connaissance de la toxicité des filtres UV, le projet pourrait permettre de développer des produits cosmétiques plus respectueux de l'environnement.

Ce projet prendra en compte la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). En ce qui concerne la règle de remplacement, ce projet nécessite l'utilisation de poissons vivants aux vues des phénomènes biologiques étudiés (comportements), de l'approche visée (physiologie intégrative). Concernant la règle de réduction, ce projet nécessite un maximum de 600 animaux (stade juvénile, sexe indéterminé). En dessous de ce nombre, les résultats ne sont plus exploitables statistiquement du fait de la forte variabilité interindividuelle des paramètres biologiques qui seront mesurées. L'espèce choisie est le mulot *Liza aurata*, un poisson dont la biologie et la zootechnie sont bien connues par notre équipe. Pour respecter la règle de raffinement, l'ensemble du projet se déroulera dans des locaux dédiés et isolés, dans des conditions d'élevage respectant les besoins physiologiques des poissons.

Lors des procédures expérimentales, des points limites à ne pas dépasser ont été définis afin de réduire la douleur infligée aux animaux. Ainsi la perte d'équilibre ou la fatigue de l'animal mettront fin à l'expérimentation pour que celui-ci retourne dans des conditions permettant sa récupération. Si la récupération n'est pas observée, l'anesthésie (ou dans les cas les plus extrêmes l'euthanasie) par utilisation d'analgésique pourra être envisagée. A la fin des procédures, les euthanasies seront effectuées par balnéation (et sédation préalable) afin de diminuer au maximum toute souffrance pour l'animal.

16974 L'anorexie mentale (AN) est un trouble psychiatrique complexe et multifactoriel qui se traduit par une restriction alimentaire ainsi qu'une constellation de troubles psychiatriques. L'AN se caractérise par une par le maintien volontaire d'une balance énergétique négative ou les apports alimentaires sont largement en deçà de la dépense énergétique. À ce jour, il n'existe pas de traitement pharmacologique efficace pour l'AN et cela est notamment dû à l'absence de modèles animaux permettant d'étudier l'anorexie. Dans le présent projet, nous visons à étudier les mécanismes génétique et environnementaux qui contribuent à l'entretien et au maintien de la maladie.

Cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen, comme la culture cellulaire, car nous regardons le comportement cognitif et le métabolisme de l'animal suite à une restriction alimentaire couplé ou non à une activité physique. Ce projet utilisera le minimum de souris nécessaire (384 souris sur les 5 ans de projet) et respectera le bien-être animal.

Lors de ces études la règle des trois R sera respectée, le nombre d'animaux sera réduit au minimum en optimisant au maximum les groupes expérimentaux et en raffinant les procédures pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Nous effectuerons lorsque nécessaire l'administration d'analgésique lors des procédures, de plus, pour poursuivre l'antalgie en post opératoire, un anti-inflammatoire sera injecté le jour suivant l'opération si besoin. Les cages sont

agrémentées d'un nid végétal et quelques croquettes sont mises à même le sol pour éviter les douleurs de tension au niveau de la suture les deux premiers jours après l'opération.

16975 L'équilibre des fonctions vitales ainsi que la fertilité de l'individu dépendent de l'activité d'une glande liée au cerveau, l'hypophyse, dont les hormones libérées dans le sang coordonnent les différents organes et tissus. Liée au cerveau, l'hypophyse est directement contrôlée par des neurones. Ces neurones sont associés à des cellules gliales spécialisées, les tanocytes, qui s'intercalent entre eux et l'hypophyse. Les tanocytes constituent une barrière mobile qui régule le message envoyé par les neurones à l'hypophyse comme le feraient des douaniers à une frontière.

Les tanocytes communiquent entre eux et avec les neurones en libérant des messagers chimiques. Parmi ces messagers, nous nous intéressons aux enképhalines. Nous voulons poser des questions simples, ce sujet étant nouveau : 1) quelle(s) catégorie(s) de tanocytes produit les enképhalines chez l'adulte ?, 2) Y a-t-il une différence entre sexe ?, 3) à partir de quel âge postnatal les enképhalines sont-elles produites ? et 4) les enképhalines modifient-elles l'activité des tanocytes ?

L'ensemble de ce projet nécessite l'utilisation de 340 souris C57BL/6J. 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 340 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 (anesthésie, analgésie, gel oculaire, tapis chauffant...).

16976 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.
- quel en est l'impact sur les principales structures cibles des neurones dopaminergiques : cortex préfrontal et nucleus accumbens.
- comment la nicotine affecte, à court et à long terme, l'activité dopaminergique et ainsi les prises de décisions.

Ces études seront réalisées chez 800 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, 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 dans plusieurs protocoles successifs quand le bien-être de l'animal le permet. 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 causales entre le comportement et l'activité de

plusieurs zones cérébrales 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.

L'utilisation d'un système miniaturisé 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 de cellules sur un même animal. Par cette technique, chaque animal pourra passer successivement dans plusieurs des protocoles comportementaux et pharmacologiques. De plus, il n'existe pas de récepteurs à la douleur à l'intérieur du cerveau : la présence de ces électrodes n'est pas douloureuse en soi. La chirurgie d'implantation des électrodes est effectuée avec le maximum de précautions prophylactiques et par l'utilisation, basée sur la littérature, d'anesthésiques gazeux et d'analgésiques (opioïdes et anti-inflammatoires).

Chaque animal est pesé avant l'opération ainsi que chaque jour post opératoire lors de soins éventuels afin d'assurer un suivi sanitaire complet pendant toute la période d'acclimatation, qui se poursuivra pendant une quinzaine de jours minimum, mais qui peut se poursuivre jusqu'à récupération d'un état de santé satisfaisant. Pendant la période de protocoles comportementaux, chaque animal est manipulé et examiné par le même expérimentateur/rice chaque jour, avec reprise des pesées si un trouble est suspecté. Un délai d'une semaine est imposé entre chaque injection pharmacologique. 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, renouvelé à chaque change de cage. Les cages sont sur un système de portoir ventilé.

16977 La mucoviscidose est une pathologie génétique mortelle, due à des mutations du gène CFTR, pour laquelle aucun traitement n'est disponible à ce jour. Cependant depuis quelques années, de nouvelles molécules permettant de corriger la cause de la maladie ont été découvertes. Ceci a permis d'augmenter l'espérance de vie des patients, mais induit l'apparition de symptômes extra-pulmonaires, telle que la maladie osseuse, qui ressemble à l'ostéoporose, avec une densité et une activité biologique osseuses réduites. Cette pathologie osseuse liée à la mucoviscidose est également présente chez les souris ayant des mutations du gène Cftr. Au laboratoire nous disposons d'une nouvelle famille de molécules, déjà validée pour son innocuité *in vitro* et *in vivo* chez la souris, et qui a fait ses preuves sur des cellules humaines pulmonaires de patients ayant la mucoviscidose, et dont l'efficacité est en cours d'évaluation dans un modèle préclinique d'inflammation pulmonaire chez les souris ayant des mutations du gène Cftr. Cependant, ce modèle ne permet pas l'étude simultanée du phénotype osseux. Dans le cadre de ce projet, nous proposons de valider l'efficacité de ces nouvelles molécules à corriger le phénotype osseux des souris ayant des mutations du gène Cftr. Pour ce faire, la molécule la plus efficace *in vitro* sera utilisée. La règle des 3Rs (Réduction/Raffinement/Remplacement) est appliquée. Afin de limiter le nombre d'animaux impliqués, au maximum, 40 souris (30 atteintes et 10 non atteintes) seront étudiées afin de mettre en évidence l'efficacité de cette molécule dans la correction de l'effet de la mutation du gène sur l'os. Cette étude est planifiée sur 2 ans. L'étude sera réalisée de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux employés en arrêtant l'expérimentation dès que des résultats statistiquement significatifs seront obtenus et en nous assurant de la faisabilité de l'obtention de ces résultats à mi-parcours. Ce projet prend en compte la prévention et le traitement des éventuelles douleurs et inconforts qui pourraient apparaître, afin d'assurer des souffrances les plus faibles possibles, voir leur inexistence, et de favoriser le bien-être des animaux tout au long de leur vie. Ainsi, à chaque manipulation, les animaux seront anesthésiés afin de limiter le stress et la douleur éventuelle des actes réalisés. Des visites régulières seront mises en place de façon à réaliser un examen clinique permettant de détecter au plus tôt tout éventuel signe de souffrance et le traiter si besoin. Les cages seront enrichies de matériaux (morceau de coton ou de sopalin, tube en carton...) permettant aux animaux d'améliorer leur milieu. Il pourrait découler de ces recherches une meilleure prise en charge thérapeutique des patients atteints de mucoviscidose.

16978 L'exposition à la fumée de cigarette et aux polluants comme l'ozone est un facteur majeur dans le développement de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Cette pathologie est

caractérisée par une inflammation anormale des voies respiratoires, une difficulté respiratoire et une altération progressive des parois alvéolaires (emphysème).

L'objectif du projet est d'étudier le rôle des acteurs impliqués dans les réponses inflammatoires et immunitaires pulmonaires déclenchées par l'exposition à la fumée de cigarette, ou plus largement à d'autres polluants environnementaux comme l'ozone, les microplastiques et les pesticides. Pour comprendre l'importance de ces voies impliquées dans les réponses inflammatoires, nous étudierons le déroulement de la maladie chez des souris déficientes pour les gènes correspondants. Les modèles murins sont en effet des outils précieux pour tester les nouvelles stratégies thérapeutiques en phase préclinique, qui ne sont pas réalisables chez l'homme.

Ce projet s'inscrit dans la continuité de travaux antérieurs qui ont conduit à la découverte du rôle important de molécules de l'hôte dans le développement de l'emphysème induit par la fumée de cigarette. Nous avons développé chez la souris des modèles d'inflammation pulmonaire et d'emphysème par exposition à la fumée de cigarette ou l'ozone. Par rapport au précédent projet « Etude de la réponse inflammatoire pulmonaire aux aérosols par la fumée de cigarette et l'ozone », ce projet élargit l'étude à d'autres polluants environnementaux comme les microplastiques et les pesticides, et à de nouveaux aspects de la réponse immunitaire comme la réponse aux acides nucléiques et aux tests de candidats médicaments. Nous disposons de lignées de souris génétiquement modifiées et d'inhibiteurs d'intérêt pour ce projet, qui permettent d'étudier les variations de la réponse immunitaire et/ou de la pathologie et de valider les hypothèses scientifiques. Les animaux immunodéficients utilisés ne présentent pas de phénotypes dommageables dans les conditions d'hébergement de l'animalerie.

La Procédure étudiera les mécanismes mis en œuvre dans l'induction d'une inflammation pulmonaire après exposition à des polluants environnementaux (partie 1), ainsi que le test de 'candidats médicaments' dans ces modèles (partie 2). Pour l'étude de l'effet aigu, 4 jours d'exposition à la fumée de cigarette (3 fois par jour) ou une seule administration de polluant environnementaux comme l'ozone ou les pesticides sera administrée. Pour étudier l'effet chronique, l'exposition régulière à la fumée de cigarette (5 fois par semaine) est prolongée pendant 6 à 12 semaines, et l'exposition aux polluants environnementaux pendant 2 à 6 semaines (2-3 fois par semaine). Afin d'approfondir l'étude de la contribution de types cellulaires spécifiques dans les réponses aux polluants, certains animaux étudiés seront issus de procédures précédentes modérées, permettant notamment d'éliminer certains types cellulaires. Ces procédures sont bien décrites dans la littérature et régulièrement mises en œuvre dans ce type d'étude. Les souris sont mises à mort en fin d'expérience pour permettre l'autopsie et les analyses biologiques.

Au cours de l'expérimentation, en fonction des modèles, les animaux peuvent présenter une perte de poids et développer une gêne respiratoire. L'exposition à la fumée de cigarette, à l'ozone ou aux polluants peut causer une gêne respiratoire avec perte de poids passagère. L'induction de pathologies pulmonaires peut affecter le bien-être animal et il convient de limiter au maximum la souffrance qui pourrait être occasionnée. Des anesthésiques seront utilisés pour les expositions et une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée. Une grille de score clinique sera renseignée quotidiennement et les animaux atteignant le point limite mis à mort.

Positionnement du projet et règle des 3R

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation à l'échelle de l'organisme. Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R :

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. Plusieurs niveaux de complexité sont nécessaires, impliquant des interactions entre différents types cellulaires et organes, qui ne peuvent être développés *in vitro* ou *in silico*.

Raffinement : Une anesthésie légère (isoflurane 1-3%) est réalisée lors d'administrations par voie intranasale ou intratrachéale. Une surveillance quotidienne des animaux est réalisée. Elle consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement et de sa mobilité et une grille de

score clinique est renseignée. Si des animaux présentent des signes de souffrance et atteignent le point limite, ils seront mis à mort.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. Pour la partie 1, chaque expérience comprend 48 souris: 8 lots de 6 souris correspondant aux animaux non génétiquement modifiés contrôles et 3 lignées génétiquement modifiées, soit exposées ou contrôles non-exposées. Il est prévu d'étudier 6 types d'exposition sur 18 lignées de souris génétiquement modifiées sur des gènes d'intérêt.

Pour la partie 2, étude préclinique de candidats médicament: chaque expérience comprend 42 souris: 7 lots de 6 souris correspondant aux contrôles non-exposés ou exposés, recevant soit aucun traitement, le véhicule ou 3 candidats médicaments à tester. Il est prévu d'étudier 4 traitements dans 6 types d'exposition.

Soit dans la partie 1: 48 souris par expérience x 6 expositions x 18 lignées= 5184 souris; et partie 2: 42 souris x 6 expositions x 4 traitements = 1008 souris ; soit 6192 souris au maximum pour 5 ans.

16979 Afin de préparer au mieux la première administration d'un futur médicament chez l'Homme, des études réglementaires de pharmacocinétique doivent être réalisées chez l'animal d'espèce rongeur et non-rongeur (références réglementaires ICH M3, S3, S6, S9). La pharmacocinétique, qui étudie le devenir du produit dans l'organisme, permet de déterminer l'exposition des animaux au produit, de définir les doses pouvant être administrées lors des premières études cliniques et de sélectionner les formulations optimales. De manière plus précoce dans les programmes de recherche, les études pharmacocinétiques fournissent des données essentielles pour caractériser les composés d'intérêt et optimiser les études pharmacologiques (ces dernières ont pour but d'étudier l'activité biologique du composé dans l'organisme).

Ce projet couvre l'utilisation de souris, rats et chiens.

Les procédures de ce projet visent à administrer aux animaux un composé à des faibles doses sans effets secondaires. Puis, des prélèvements sanguins, et uniquement chez le rongeur des prélèvements biliaires et urinaires, sont réalisés à différents temps sur une période allant de 1 à 28 jours. Chez les rats les prélèvements réalisés peuvent nécessiter une phase chirurgicale de cathétérisation (canal biliaire, et/ou vaisseaux sanguins). Ces procédures peuvent entraîner un inconfort léger et transitoire chez le chien. Pour les rongeurs du fait des phases chirurgicales et des prélèvements urinaires le degré de gravité attendu sera au plus haut de classe modérée. Une surveillance quotidienne et une attention particulière, permettront de détecter et soulager tout inconfort, douleur, ou détresse de l'animal qui irait au-delà du niveau attendu.

Il n'existe pas à ce jour de méthode substitutive aux études pharmacocinétiques *in vivo*. Les tests *in vitro* et *in silico* permettent d'étudier certains aspects de la pharmacocinétique (absorption, métabolisme) mais ne peuvent pas fournir l'ensemble des éléments caractérisant le devenir du médicament dans un organisme vivant depuis son absorption jusqu'à son élimination. Afin de limiter le recours aux animaux, les molécules testées *in vivo* sont sélectionnées sur la base des résultats obtenus dans les modèles cellulaires et informatiques. Le nombre d'animaux utilisés dans les études pharmacocinétiques est basé sur les lignes directrices ICH et se limite au strict nécessaire pour atteindre l'objectif scientifique. Dans le cas des études non réglementaires, une analyse biostatistique réalisée par un expert interne permet d'optimiser les effectifs et les designs d'étude. Par ailleurs, le développement de méthodes de dosage adaptées à des micro-volumes de sang permet de réaliser des prélèvements répétés chez un même animal - souris ou rat - et d'utiliser ainsi moins de rongeurs dans ce projet. La réutilisation des chiens est également possible dans des conditions liées à leur bien-être et à l'élimination du composé testé. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec de l'enrichissement et des interactions quotidiennes avec le personnel. La manipulation, les techniques d'administration et de prélèvement sont réalisées selon les bonnes pratiques vétérinaires.

A la fin de la procédure, les rongeurs sont euthanasiés et les tissus peuvent être prélevés pour évaluer la distribution du composé dans les organes. Les chiens sont réutilisés après avis favorable du vétérinaire, et entrent ensuite dans un programme de placement (adoption).

Nombre maximum d'animaux utilisés sur 5 ans

16980 La filière palmipède à foie gras et la société sont très attachées à l'élevage de canards plein-air. L'accès des animaux à un espace extérieur enherbé, appelé parcours peut présenter de multiples atouts. Par ailleurs, depuis quelques années et suite au contexte sanitaire dans la filière, la façon de produire les animaux a évolué.

Pour ce faire, la filière développe de plus en plus des bâtiments en dur, équipés de systèmes d'alimentation à l'intérieur, avec parfois une entrée des animaux la nuit. L'éleveur joue toujours un rôle fondamental auprès de ses animaux, assurant une surveillance et un suivi régulier. La filière attache ainsi une grande importance à développer des systèmes de production répondant aussi aux enjeux de préservation du bien-être animal et de réponse au défi climatique, dont le parcours peut présenter de multiples atouts. De fait, dans ce projet, le volet environnemental sera abordé suivant deux objectifs :

Volet 1- Calculer la part de rejets maîtrisables en considérant un système de production qui tend à se développer (semi plein-air, avec entrée des animaux la nuit). Les rejets maîtrisables correspondent aux rejets produits à l'intérieur du bâtiment par les animaux, notamment en azote.

En élevage de palmipèdes, le document de références pour calculer les rejets des élevages est le document du CORPEN volailles, datant de 2013. Toutefois, au regard des modifications des schémas de production, il apparaît opportun de remettre à jour ces références afin de mieux les faire correspondre aux réalités du terrain. Par ailleurs, dans le cadre de la directive Nitrates, il apparaît aussi essentiel de pouvoir actualiser les parts de rejets maîtrisables afin de calculer de manière plus précise les surfaces d'épandage nécessaires, utilisées pour épandre le fumier produit après chaque bande d'élevage. La directive Nitrates est une directive qui a pour objectif de réduire la pollution des eaux provoquée par les nitrates d'origines agricoles, en limitant la quantité de fumier épandue par hectare.

Cette partie mettra en essai 1 280 canards mulards, dont 640 animaux seront élevés en système semi plein-air et 640 animaux en système claustration totale. Le mode semi plein-air correspond à un modèle intermédiaire où les animaux ont accès à un extérieur uniquement en journée. Aussi, en comparant les excréments des animaux conduits en claustration à ceux conduits en système semi plein-air, il sera possible, par différence, de calculer la part de rejet maîtrisables, afin d'identifier les surfaces nécessaires à la dispersion des fientes au champ.

Volet 2- Mettre au point une grille d'évaluation des services rendus par les parcours en mesurant différents paramètres (biodiversité, bien-être animal, ...)

L'objectif ici sera d'identifier les contributions apportées par les parcours à différentes échelles, afin d'adapter en fonction les préconisations et conseils aux éleveurs. Cet essai est conduit dans le cadre d'une étude plus large, comprenant un panel de différents parcours en France. Elle aura pour but, après avoir effectué des tests d'indicateurs, d'établir une méthode d'évaluation de la multifonctionnalité des parcours.

Dans notre cas, les systèmes testés comprendront un parcours arboré avec incorporation de bois plaquette, un parcours arboré sans incorporation de bois plaquette et un parcours herbeux avec incorporation de bois plaquette, au niveau des zones les plus fréquentées par les animaux. Le bois plaquette correspond à du bois broyé en petits morceaux, souvent utilisé en jardinerie. Dans les parcours de canards, le bois plaquette est utilisé pour stabiliser les zones les plus fréquentées par les animaux, permettant ainsi de maintenir une meilleure qualité du sol, en favorisant l'absorption de l'eau. Cette partie mettra en essai 1 800 canards conduits sur 3 parcours comprenant chacun 600 animaux.

En observant les comportements des animaux durant toute la phase d'élevage, leur répartition spatiale et en effectuant un suivi du poids et des états corporels des canards, des conclusions pourront être apportées sur l'impact de l'aménagement du parcours sur les animaux. Elles seront complétées a posteriori par les résultats obtenus dans les autres parcours du panel du projet global, à échelle nationale.

Les deux volets du projet ont donc pour objectifs d'actualiser les références en rapport au mode de production actuel, en élevage de palmipèdes à foie gras et de générer des données utiles pour

encourager l'aménagement des parcours. Ainsi, les conditions d'expérimentation devront être similaires à celles réalisées sur le terrain.

Respect de la règle des 3 R :

- Reduce (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation : au total, 3080 canards seront mis en essais, dont 1280 pour le volet 1 du projet et 1800 pour le volet 2. Après démarrage dans un même bâtiment, les animaux seront répartis en 2 lots de 640 animaux pour le volet 1 et en 3 lots de 600 animaux pour le volet 2, élevés de 20 à 84 jours. Après cette période, pour chaque modalité, 100 animaux pour le volet 1 et 50 animaux pour le volet 2 seront euthanasiés sur la station expérimentale, pour une dissection anatomique. Le reste des animaux sera gavé soit sur la station expérimentale (pour 672 animaux du volet 1) et le reste sera vendu pour un gavage commercial. Ainsi, le nombre d'animaux utilisé permettra d'atteindre dans nos bâtiments expérimentaux, les densités d'intérêt pour l'étude tout en assurant de pouvoir détecter un écart de performances entre les groupes comparés.
- Refine (Raffiner) la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : Des points limites ont été définis pour les deux phases de l'expérience (d'une atteinte moyenne, correspondant aux animaux prostrés ou blessés ; à une atteinte sévère, correspondant à des animaux incapables de se déplacer ou en détresse respiratoire). Les conditions d'élevage et d'hébergement des animaux seront conformes à la réglementation en vigueur dans la filière. En effet, l'objectif ici sera de placer les animaux dans des conditions d'élevage et d'hébergement similaires à celles pratiquées dans les élevages commerciaux. Le nombre de manipulations sera limité à 3 pesées couplées à une évaluation de l'état corporel. Ces manipulations seront réalisées par du personnel formé et compétent et dans une station expérimentale détenant un agrément pour ce faire.
- Replace (Remplacer) les modèles animaux : Nous ne pouvons pas utiliser de méthode substitutive puisqu'il s'agit de l'évaluation de ces mêmes animaux.

16981 Les surexpositions accidentelles aux rayonnements ionisants concernent différentes catégories de personnes (travailleurs, patients, public). Ces expositions peuvent être individuelles lors d'accident radiologique ou, au contraire, de grande ampleur lors d'acte de malveillance. L'irradiation à fortes doses peut conduire à l'apparition, plusieurs années après l'accident, à une fonte musculaire importante (rhabdomyolyse), associée à de la fibrose pouvant aller jusqu'à la nécrose. Par conséquent, des thérapies doivent être développées afin de prendre en charge ces patients pour limiter les complications.

Le but du projet est de déterminer si les cellules du système immunitaire peuvent être une cible de choix comme approche thérapeutique pour le développement des complications après exposition accidentelles aux rayonnements ionisants.

Pour évaluer notre hypothèse dans les conditions physiologiques, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques. La lésion tissulaire sera réalisée par injection intra-musculaire d'une toxine provenant de venin de serpent au niveau de la patte de l'animal anesthésié au préalable. Les lésions musculaires induites par cette toxine sont similaires à celle observées après irradiation. Elle induit l'apoptose des cellules musculaires associée à un recrutement massif de cellules inflammatoires. Ces modèles *in vivo* permettent de modéliser les lésions tissulaires observables chez l'homme et ne pourrait être remplacés par les modèles *in vitro* actuellement disponibles. L'évaluation des paramètres physiologiques (sang, moelle osseuse, rate et muscles) se feront sur des prélèvements réalisés sur des animaux anesthésiés avant ou après euthanasie. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 60.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour obtenir des résultats pertinents. Les animaux qui présenteraient des problèmes de locomotion des croquettes et/ou du gel seront mis à leur disposition directement dans la cage. En dernier recours, si les animaux atteignent les points limites définis (perte de 20% du poids, piloérection, prostration), ils seront euthanasiés afin de limiter leur souffrance et angoisse.

Les études moléculaires et cellulaires se feront sur des prélèvements réalisés sur l'animal anesthésié avant ou après euthanasie.

16982 L'émergence de nouveaux agents pathogènes chez l'Homme ou l'animal peut générer d'énormes problèmes de santé publique, et avoir un impact économique important à l'échelle mondiale, en grande partie en raison du manque d'immunité préexistante. Chaque année, les épidémies saisonnières annuelles de grippe touchent 2 à 8 millions de personnes en France par an, avec une mortalité comprise entre 10000 et 15000. Plus récemment, en fin d'année 2019, un nouveau coronavirus (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 - SARS-CoV-2) qui provoque des maladies respiratoires, et hautement contagieux chez les humains, a été détecté à Wuhan en Chine. Le 11 mars 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé a déclaré que les infections causées par ce nouveau coronavirus avaient atteints des proportions pandémiques.

La nature très contagieuse de ces maladies est liée à la transmission des virus entre les individus par l'air et les voies respiratoires.

L'apparition de mutations virales ou de nouveaux virus sont donc un problème d'actualité à l'échelle mondiale.

Une stratégie clé pour protéger les humains de ces virus et ces pandémies est le développement de vaccins et de thérapies efficaces.

L'objectif de ce projet est donc tout d'abord de mettre au point des modèles, stables et reproductibles, de maladies virales respiratoires, avec une caractérisation précise des signes cliniques que provoquent les virus chez les animaux, et la chronologie de leur apparition, afin de mieux connaître les points limites.

Lors de l'infection par un virus de l'Homme, toutes les espèces animales ne réagissent pas de la même façon, et parfois, l'infection est asymptomatique, même si le virus se développe, en provoquant une réaction immunologique. Dans ce cas, le modèle est intéressant et provoque peu d'inconfort aux animaux. Dans d'autres cas, le virus provoque une maladie équivalente à la maladie humaine et il convient dans ce cas de suivre et limiter les effets délétères sur les animaux.

Ensuite, le but sera de tester différents types de thérapies et différents candidats vaccins, afin de pouvoir les utiliser dans le futur en clinique humaine.

Par conséquent, des modèles animaux dont la pathogenèse de la maladie, induite par ces virus, est étroitement similaire à la pathogenèse chez l'Homme sont indispensables pour la recherche sur ces maladies. Cette phase animale est primordiale pour tester des candidats thérapeutiques et aucune méthode alternative n'est possible actuellement, à part les études cliniques chez le patient humain.

La souris, le hamster et le furet sont les trois modèles très utilisés pour des études sur les virus respiratoires et de nombreuses données sont disponibles dans la littérature scientifique.

Le projet utilisera au maximum 720 souris, 720 hamsters et 120 furets.

Toutes les compétences sont mises en œuvre pour limiter au maximum le mal être que la procédure peut occasionner aux animaux. Selon la voie d'administration, les infections et les traitements sont réalisés sous anesthésie générale avec surveillance étroite du réveil. Les animaux sont hébergés dans le respect de leurs besoins éthologiques avec enrichissement du milieu. Un suivi clinique étroit après l'infection est réalisé fréquemment par des techniciens animaliers qualifiés et des vétérinaires. Des points limites suffisamment prédictifs sont définis et permettent à tout moment d'arrêter le protocole pour un ou des animaux si leur état de santé le justifie.

16983 Les cardiomyopathies sont des maladies du myocarde associées à un dysfonctionnement cardiaque. Elles sont majoritairement (> 60%) d'origine génétique.

Les cardiomyopathies hypertrophiques (CMH) sont caractérisées par une hypertrophie asymétrique du ventricule gauche, causes fréquentes d'insuffisance cardiaque, d'arythmie, d'accidents vasculaires cérébraux et d'arrêt cardiaque (incidence 1:500).

Notre projet vise à traiter la CMH liée à un défaut du gène codant pour la protéine C cardiaque (MYBPC3), mutations qui constituent 30-40% des cas de CMH d'origine génétique.

A ce jour il n'existe pas de traitement curatif.

Parmi les développements actuels d'approches de thérapie génique basée sur l'utilisation d'un vecteur recombinant dérivé d'un virus adéno-associé (AAV), une première application expérimentale réussie

chez la souris avec la cardiomyopathie hypertrophique mybpC3, et la preuve de l'efficacité de cette méthode dans les cardiomyocytes humains mutés, suggèrent que de telles approches pourraient traiter les cardiomyopathies monogéniques dont la CMH.

Ces approches doivent permettre d'administrer efficacement les vecteurs thérapeutiques au niveau du muscle cardiaque, en limitant l'exposition à d'autres organes, et sans avoir à subir les effets secondaires liés aux doses d'AAV.

Une perfusion locorégionale (PLR) du cœur battant pourrait assurer cela si la perte du vecteur dans la circulation générale reste limitée, et si la PLR peut assurer une oxygénation adéquate du myocarde.

La PLR sera comparée à une injection intra-coronarienne (groupe contrôle).

La stratégie chirurgicale envisagée permet l'apport d'oxygène et le traitement du cœur battant, isolé de la circulation cardiovasculaire générale. Elle est basée sur l'oxygénation de la membrane extracorporelle (ECMO).

La faisabilité de cette approche hémodynamique a déjà été démontrée chez sept porcs domestiques qui ont tolérés l'oxygénation du cœur battant pendant 60 minutes.

L'objectif général du projet est de réaliser ces expérimentations chez le porc domestique adulte afin d'évaluer la tolérance, la toxicité et la biodistribution d'un vecteur AAV, 2 semaines après PLR du muscle cardiaque chez le porc domestique adulte.

Ce projet se compose ainsi :

Phase I : Etude de faisabilité technique de la PLR qui permettra de valider le transfert de technologie et de former le personnel.

1 à 2 porcs maximum recevront le tampon de formulation (véhicule) de l'AAV pendant 60 minutes. Ces animaux serviront de groupe témoin.

Phase II : La durée de la PLR et la quantité de vecteurs délivrés seront les 2 paramètres évalués (3 temps de perfusion et 4 doses de vecteurs au maximum). Cette phase est constituée de 4 études séquentielles maximum.

En fonction des résultats de chaque étude ces 2 paramètres seront ajustés afin d'obtenir une transduction maximale et spécifique des tissus cardiaques avec un minimum de vecteurs et un temps de perfusion le plus réduit possible.

L'enchaînement des 4 études est lié à une série de « GO/NO GO », cf. Annexe 1.

Chacune des 4 études sera composée de :

- un groupe « PLR » : 5 porcs maximum (2 minimum).
- un groupe contrôle (injection intra coronaire) : 2 porcs maximum (1 minimum).

Amendement : lors des études de la phase II, un système de surveillance du rythme cardiaque sera implanté avec enregistrement en continu permettant d'alerter et d'intervenir en cas de troubles cardiaques.

Amendement : Une fois la dose optimale définie, 3 porcs maximum (1 minimum) recevront une dose équivalente de vecteur par injection intraveineuse (IV) comme groupe contrôle de l'intra coronaire

Toute intervention chirurgicale cardiaque entraîne un risque accru pour l'animal. D'où la possibilité d'une interruption prématurée de l'expérience en cas, d'arythmies cardiaques, fibrillation ventriculaire, ou autres complications.

Les études de la phase II seront stoppées dès que le temps de perfusion et la quantité de vecteurs fixés seront atteints, minimisant ainsi le nombre d'animaux inclus.

Au maximum de 33 animaux seront donc inclus pour les phases I, II et l'IV.

Un suivi de 14±1 jours post-injection maximum sera réalisé (voir annexe 2). Différents examens seront réalisés afin d'en évaluer l'effet sur les fonctions cardiaques (échocardiographie, IRM et fluoroscopie/angiographie).

Des prélèvements sanguins seront réalisés pour un bilan sanguin, dosages de marqueurs immunologiques, cardiaques et des gaz du sang.

Après sacrifice, les prélèvements post-mortem permettront d'évaluer la biodistribution du vecteur et l'expression protéique.

1) Réduction : Un maximum de 33 porcs adultes femelles seront inclus dans ce projet.

Pour chacune des 4 études de la phase II :

- un groupe « PLR » : 5 porcs maximum (2 minimum).

- un groupe contrôle (injection intra coronaire) : 2 porcs maximum (1 minimum).

Si les objectifs d'une étude de la phase II sont atteints (durée de la perfusion et quantité de vecteur nécessaire à la transduction ciblée $\geq 80\%$) pour le groupe PLR avec de 2 animaux minimum, et pour le groupe contrôle avec un animal minimum, l'étude sera interrompue et l'étude suivante débutera.

Il est prévu 4 études principales mais ce nombre pourra être réduit, minimisant ainsi le nombre d'animaux.

Ce projet est une preuve de concept pour lequel nous ne cherchons pas d'analyses statistiques.

2) Raffinement : - De bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur, avec un enrichissement du milieu et mise à disposition d'objets (Box équipés de planche anti-démangeaisons, balles, Kong dental...).

- intervention de personnels formés spécifiquement à ce type d'intervention

- un suivi observationnel et clinique régulier des animaux

- toutes les interventions seront réalisées sur animal anesthésié. Les procédures d'anesthésie légère (Imagerie, IV) ou profonde (chirurgie), sont détaillées ci-après.

- Un traitement peri-opératoire avec analgésiques sera mis en place pour limiter la douleur.

- un suivi post-chirurgical par un vétérinaire et technicien animalier sera réalisé

- Une grille de scoring de la douleur sera mise en place afin de détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates.

3) Remplacement : L'expérimentation animale proposée vise à établir la PLR du cœur battant, aussi un organisme intact est requis.

Les processus complexes (consommation d'O₂, changements de pH...) qui doivent être contrôlés ne peuvent pas être simulés par des modèles *in vitro*.

L'étude de la transduction cœur par les AAV en comparaison avec autres organes non-ciblés (biodistribution) permettant d'évaluer l'efficacité et la sécurité du futur produit thérapeutique ne peut-être réalisée que sur animal vivant.

16984 Contexte et objectifs:

Les maladies inflammatoires aiguës et chroniques peuvent toucher plusieurs organes, être invalidantes et représentent une cause majeure de morbidité et mortalité. L'inflammation chronique peut par exemple contribuer à l'athérosclérose ou à l'arthrite. L'athérosclérose est une maladie caractérisée par le dépôt de cholestérol dans les artères et une inflammation chronique (cad. Persistante) de la paroi des vaisseaux. Elle et peut conduire à l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral. L'arthrite est une maladie des articulations caractérisée par une inflammation persistante de la membrane synoviale qui secrète du liquide synovial en excès. L'arthrite se manifeste par des douleurs nocturnes, surtout en seconde partie de nuit et des raideurs matinales, indiquant des variations des symptômes au cours de la journée (variations circadiennes). Le point commun à ces maladies est un dérèglement du système immunitaire qui devient intolérant à ses propres constituants ou vis à vis de l'accumulation de cristaux (de lipides, etc..) et déclenche une réaction inflammatoire. Les traitements actuels sont peu efficaces et peuvent conduire, au long cours, à des effets secondaires. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre recherche.

Nous travaillons à mieux comprendre les fonctions physiologiques des récepteurs nucléaires Rev-erba et Rev-erbb, et déterminer s'ils peuvent être utilisés pour la validation de nouveaux traitements contre ces maladies. Rev-erba et Rev-erbb sont des protéines de l'horloge biologique dont le rôle est de rendre silencieux certains gènes de manière circadienne, càd. à des moments précis de la journée auxquels

ils ne doivent pas être exprimés (mais qui le sont de manière inappropriée dans la maladie). Nos résultats obtenus *in vitro* (avec des cellules) ou à partir d'expériences exploratoires récentes démontrent que Rev-erba et Rev-erbb répriment des gènes pro-inflammatoires. Par exemple, l'invalidation de Rev-erba au sein des macrophages augmente une voie inflammatoire de réponse au stress, l'inflammasome. Cette voie, qui conduit à la production de signaux pro-inflammatoires, est anormalement activée par exemple par une accumulation de cholestérol (cas de l'athérosclérose) et dans l'arthrite. Au contraire, l'ajout d'une molécule activatrice de Rev-erba permet de diminuer l'inflammasome.

L'objectif de ce projet est de démontrer, grâce à des modèles murins d'invalidation ou de sur-expression, l'implication des Rev-erb dans la régulation de l'inflammasome et d'en évaluer les conséquences pathophysiologiques dans des modèles d'inflammation modérée aiguë et chronique. Ce projet fera donc avancer les connaissances sur les fonctions physiologiques des Rev-erb. Nous évaluerons aussi l'effet anti-inflammatoire d'un activateur de Rev-erb. Si l'effet est avéré, ces molécules pourraient être développées à des fins thérapeutiques dans le traitement des maladies inflammatoires aiguës et chroniques.

Justification de l'expérimentation décrite et méthodes mises en œuvre pour réduire le nombre d'animaux:

Le système immunitaire met en jeu plusieurs types de cellules qui sécrètent des signaux pro-inflammatoires pour communiquer entre eux, afin de moduler la réponse inflammatoire. La sécrétion de ces signaux, et le recrutement des cellules immunitaires, sont soumises à des variations circadiennes. Ainsi, mieux comprendre le rôle des Rev-erbs nécessite d'évaluer leur implication sur ces différents processus à différents moments du cycle jour/nuit à l'échelle de l'organisme entier *in vivo*, même si l'étude des mécanismes moléculaires responsables sera menée *in vitro* sur des cellules. De plus, nous devons déterminer si les activateurs de Rev-erb ont une action anti-inflammatoire significative *in vivo*. Nous avons mis en place un modèle mathématique pour modéliser les variations circadiennes afin de diminuer le nombre de souris étudiées en faisant des prédictions sur l'heure d'administration optimale d'un activateur de Rev-erb. Enfin, 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 2160 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 invalidations ou sur-expression n'engendrent, par elles-mêmes, aucune souffrance. Nous aurons aussi recours à une greffe de moelle osseuse. Ces souris seront soumises à un stress inflammatoire modéré aiguë ou chronique et traitées ou non avec une molécule à visée thérapeutique. Les modèles utilisés sont des régimes hypercholestérolémiants non douloureux, ou l'injection d'un constituant externe de la paroi des bactéries pour mimer une péritonite sans injection de bactéries; enfin, nous utiliserons un modèle aigu d'arthrite par injection d'hydroxyapatite.

Les procédures décrites ont déjà été revues et acceptées par le comité local d'éthique en expérimentation animale.

Il est important, s'agissant d'évaluer l'inflammation chez nos souris, 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.

16985 Une biopsie est un prélèvement d'un fragment de tissu d'un être vivant, en vue d'un examen microscopique, afin de déterminer la nature exacte du tissu. Ce prélèvement peut être réalisé au moyen d'une aiguille, par exemple pour une biopsie pulmonaire (biopsie trans-thoracique à l'aiguille), ou lors d'une chirurgie, par exemple pour une biopsie musculaire.

Comme tout acte médical, la biopsie peut présenter des complications plus ou moins importantes. D'après une étude statistique de janvier 2017, le taux de complication pour une biopsie trans-thoracique est d'environ 34%, avec un taux de 6% pour les complications mortelles. D'après cette même étude, le taux de pneumothorax est de 29%. D'autres études ont montré qu'après une biopsie trans-thoracique, environ un tiers des patients développent un pneumothorax.

Le pneumothorax est une entrée d'air, plus ou moins importante, dans l'espace pleural, c'est-à-dire entre la paroi thoracique et le poumon. Ce phénomène cause principalement une gêne respiratoire et des douleurs dans le thorax, le dos et l'épaule. Dans de rares cas (inférieurs à 5%), il peut aussi entraîner des crachats de sang.

Dans la majorité des cas, les symptômes disparaissent spontanément. Toutefois, dans environ 5% des cas, il est nécessaire de placer un drain pour évacuer l'air.

L'objectif de ce projet est de tester de nouveaux dispositifs médicaux permettant de réduire le risque de pneumothorax lors d'une biopsie trans-thoracique. Ces dispositifs délivrent une petite quantité de gel biodégradable dans l'espace pleural, au niveau de la zone d'intérêt, avant la réalisation de la biopsie. Lors du retrait de l'aiguille, le gel comble son trajet, et ainsi empêche l'entrée de l'air dans l'espace pleural et donc le pneumothorax.

Les études permettront de vérifier la faisabilité et la fiabilité du dispositif, ainsi que de suivre la dégradation, voire la migration possible du gel.

Cette phase animale est indispensable pour tester les dispositifs médicaux et aucune méthode alternative n'est possible actuellement. Le porc est considéré comme le modèle de prédilection dans de nombreuses études, notamment dans le domaine pulmonaire. La taille du porc en fait un très bon modèle et permet de tester de nombreuses interventions chirurgicales réalisées chez l'Homme, comme la biopsie pulmonaire. Nous utiliserons au maximum 96 porcs au total dans ce projet sur 5 ans. Ce nombre permettra l'obtention de résultats scientifiquement exploitables.

Toutes les compétences sont mises en oeuvre pour limiter au maximum la douleur que la procédure peut occasionner aux animaux. L'intervention est réalisée sous anesthésie générale avec une couverture analgésique attentive. Les animaux sont hébergés dans le respect de leurs besoins éthologiques avec enrichissement du milieu. Si nous les hébergeons seuls, le temps d'isolement est limité au strict nécessaire. Un suivi clinique étroit après l'intervention chirurgicale est réalisé quotidiennement par des techniciens animaliers et des vétérinaires, avec mise en place d'un protocole analgésique adapté pendant plusieurs jours. De plus, des points limites suffisamment prédictifs sont définis permettant de sortir un animal de l'étude.

16986 L'arthrite est une maladie chronique inflammatoire fréquente dans la population et qui est très invalidante. Une boucle de rétroaction, appelée inflammation neurogénique, existe entre le processus inflammatoire d'une part et les fibres des systèmes nerveux sensoriel, sympathique et parasympathique innervant l'articulation enflammée d'autre part. Une forte réorganisation du réseau de ces fibres nerveuses est observée dans cette pathologie. Néanmoins les techniques d'imagerie classiques ne permettent pas d'analyser finement cette réorganisation et d'en appréhender son rôle potentiel dans la pathologie.

Le but de ce projet est de caractériser le remodelage structural des fibres nerveuses dans l'articulation arthritique par la technique d'imagerie par feuillet de lumière qui permet de visualiser un organe entier en 3D. Cette étude permettra de mieux caractériser les interactions des fibres nerveuses avec les vaisseaux sanguins et les cellules du système immunitaire (macrophages). Elle permettra aussi de définir le rôle de canaux ioniques dans ce remodelage. Cette étude apportera des informations clés pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour réaliser ce projet, 250 souris seront utilisées afin de réaliser un ensemble de marquages immunofluorescents des fibres nerveuses, des vaisseaux sanguins et des cellules immunitaires, à 2

stades clés de la pathologie. La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée ; Remplacement : le remodelage des fibres nerveuses ne peut s'évaluer in fine que sur des animaux vivants. Réduction du nombre d'animaux : les pattes controlatérales serviront de contrôle aux pattes enflammées et des doubles ou triples marquages seront réalisés simultanément quand cela est possible pour limiter le nombre d'animaux utilisés. Raffinement : le nombre de souris par cage respectera les directives européennes du 1er février 2013, sachant que le projet utilise de jeunes adultes entre 20 et 25g, nécessitant 70 cm² par individus dans les cages, soit 5 animaux par cage de 374 cm². L'environnement des animaux sera enrichi avec des dômes en carton. Une surveillance accrue des animaux et la définition de points limites permettra d'éviter la souffrance des animaux au cours du développement de la pathologie. Les animaux recevront de fortes doses d'analgésiques et d'anesthésiques pour réduire toute douleur au moment de la perfusion.

16987 Les sarcomes des tissus mous sont des tumeurs rares très complexes et hétérogènes (plus de 70 sous-types différents) qui touchent environ 4000 personnes par an en France. Après la chirurgie, peu de traitements sont disponibles hormis des chimiothérapies classiques souvent peu efficaces. Il existe donc dans cette pathologie un réel besoin de nouvelles thérapies plus ciblées permettant une meilleure efficacité et moins d'effets secondaires pour les patients.

Notre équipe est localisée dans un centre de référence dans le traitement de ce cancer rare, ce qui nous offre la possibilité d'obtenir des tumeurs de patients et ainsi de pouvoir développer des lignées cellulaires et des modèles de souris xénogreffées avec ces tumeurs. A partir de ces modèles, nous avons mis en place une plateforme préclinique qui nous permet d'étudier les effets biologiques et pharmacologiques de nouveaux médicaments en développement. Ces nouveaux composés sont dans un 1er temps testés *in vitro* sur des cellules en culture et dans la mesure où ils sont concluants, ils seront testés sur des souris immunodéficientes auxquelles on aura préalablement implanté des tumeurs de patients (PDX) quand cela est possible ou des lignées cellulaires (xénogreffes). La grande majorité des nouveaux médicaments développés aujourd'hui sont des thérapies ciblées que nous testerons seules (monothérapie) ou en combinaison avec une chimiothérapie standard (la doxorubicine ou la gemcitabine). Dans ce cadre, nous prévoyons de tester 5 nouvelles molécules par an dans un minimum de 3 modèles (PDX et/ou xénogreffes). Nous estimons à 52 le nombre de souris nécessaires par modèle pour obtenir un suivi et des tests statistiques robustes. A cela s'ajoute 6 souris par molécule pour les tests de toxicité. Nous demandons donc un total de 4050 souris sur une durée de 5 ans (5 molécules x 3 modèles x 52 souris x 5ans + 5 molécules x 6 souris (tox) x 5 ans =4050).

Ces expériences *in vivo* seront réalisées dans les meilleures conditions éthiques en respectant la règle des 3Rs (Réduire, raffiner, remplacer) et conformément à la législation en vigueur.

Remplacement : Ces expérimentations s'inscrivent dans un projet de recherche translationnelle qui vise à élargir l'éventail thérapeutique dans le traitement des sarcomes des tissus mous. Nous avons étudié les effets biologiques et pharmacologiques de nombreuses nouvelles molécules en développement sur des lignées de sarcomes *in vitro*. Nous souhaitons dorénavant étendre ces études à un modèle plus complet qu'est le petit animal. En effet, l'oncogenèse est un modèle intégré qui fait 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 avant de pouvoir réaliser les essais chez l'homme.

Réduction : Nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. La croissance tumorale des cellules greffées sera suivie de manière longitudinale tout au long des expériences ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés, le but étant d'obtenir des données significatives d'efficacité du médicament.

Raffinement : Toutes les expérimentations sont réalisées par du personnel qualifié. 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).

16988 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente. Elle est caractérisée par des troubles de la coordination motrice, de la rigidité musculaire, des tremblements et une lenteur d'exécution des mouvements. La maladie de Parkinson frappe aujourd'hui 200,000 personnes en France. Son incidence (nombre de nouveaux cas par unité de temps) est proche de 20 nouveaux patients pour 100.000 habitants, par an. Les troubles moteurs engendrent rapidement une dépendance physique qui impact négativement la qualité de vie du patient et de son entourage proche. Le manque de médicaments efficace contre la maladie représente un défi majeur pour la santé humaine. Le développement de nouveaux modèle animaux de la maladie de Parkinson est nécessaire pour promouvoir la recherche et le développement de candidats-médicaments pour cette maladie.

L'objectif de ce projet est de développer et valider un modèle de souris pour la maladie de Parkinson, basé sur l'injection stéréotaxique d'oligomères d'alpha-synucléine, en lien avec l'inhibition d'une protéine lysosomale, l'enzyme GBA. Ce peptide et la perte d'activité de cette enzyme sont directement mis en cause dans la progression de la maladie chez les patients.

À cette fin, le nombre estimé de souris utilisées sera de 290. Cet effectif permettra de constituer des groupes expérimentaux nécessaires au projet.

Le projet se base sur 3 procédures expérimentales dépendantes et complémentaires. Afin de réduire le nombre d'animaux, les procédures 2 et 3 ne seront initiées que si la procédure 1 conduit à des résultats statistiquement significatifs.

Au cours de ce projet, une attention particulière sera apportée au respect de la règle des trois R.

Remplacement : Pour les raisons mentionnées dans la section "justification de l'utilisation des animaux", il ne sera pas possible de remplacer cette étude par des stratégies *in vitro* et/ou *in silico*. Brièvement, la maladie de Parkinson est caractérisée par l'interaction de plusieurs types cellulaires et plusieurs structures cérébrales, qui ne peuvent pas être reproduite *in vitro* ou *in silico*.

Réduction : Le nombre de souris (n par expérience) a été optimisé pour assurer l'obtention de résultats statistiquement significatifs. À cette fin, des études antérieures disponibles dans la littérature scientifique suggèrent un nombre minimal de 10 souris par groupe, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs en termes de (i) % de neurodégénérescence, et (ii) d'apparition de troubles moteurs ; deux caractéristiques essentielles et déterminantes dans la patho-physiologie de la maladie de Parkinson.

Raffinement : nous incluons des procédures visant à améliorer le bien-être des animaux, en nous basant sur:

(i) la présence d'objets d'enrichissement,

(ii) des stratégies d'analgésies pré-chirurgie et post-chirurgie,

(iii) et le contrôle strict des besoins physiologiques des animaux (température corporelle) pendant et après l'opération (pour assurer un rétablissement rapide).

Les animaux seront hébergés par deux au minimum (5 au maximum), en cages ventilées, avec accès ad libidum à l'eau et à la nourriture.

Ce projet expérimental permettra de développer un modèle animal de la maladie de Parkinson afin de tester de nouveaux candidats médicaments pour cette maladie incurable.

16989 Malgré des progrès considérables pour améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux, la présence de résistances de ces tumeurs aux traitements est un phénomène fréquent qui conduit bien souvent à l'échec thérapeutique. Une des stratégies pour contourner ces résistances repose sur l'association de médicament anticancéreux couramment utilisés à différentes molécules permettant de mieux cibler les cellules tumorales. Dans ce travail, le médicament utilisé est un anticancéreux appelé « gemcitabine » et il est couplé à une molécule lipidique.

Pour comprendre les mécanismes impliqués et vérifier de ces couplage « médicament-lipide » nous allons utiliser deux types de couplage « anticancéreux-lipide » et les injecter à des souris porteuses de cancer du sein.

Le présent projet vise à étudier les effets de la Gemcitabine seule (Gem) et des couples gemcitabine-lipide (SQ-Gem) au niveau cellulaire et tissulaire. Nous chercherons à comprendre les mécanismes de transport utilisés par ces souches « anticancéreux-lipide » pour pénétrer la cellule tumorale, à identifier les modifications induites par les médicaments à l'intérieur de la cellule tumorale. L'hypothèse est que le médicament couplé au lipide présente des avantages en matière de meilleure distribution, efficacité anticancéreuse et moindre toxicité que le médicament sous sa forme libre.

Après développement des tumeurs chez les Souris, une technique d'imagerie sera utilisée en association à une méthode de prélèvement appelée « microdialyse ». Ces deux méthodes combinées permettront de caractériser le comportement des différentes formes du médicament aussi bien en matière de concentration dans la tumeur que de mécanisme d'action intra-tumoral. Cette recherche s'inscrit donc dans les approches ayant recours à l'expérimentation animale

Le stress des animaux sera pris en charge : en respectant une période de stabulation de 7 jours après réception ; en hébergeant les animaux en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie; et en leur mettant à disposition un enrichissement matériel spécifique à l'espèce utilisée.

Des critères d'interruption seront définis et vérifiés tout au long de ces études. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal suivant une grille établie lors des expérimentations précédentes et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible. Toute anomalie clinique sera rapportée au responsable sanitaire de l'établissement. Des mesures thérapeutiques seront prises pour traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés (injection de fluides, isolement, réchauffement, etc).

Le nombre d'animaux est de 90 souris au maximum sur l'ensemble du projet. Le nombre d'animaux utilisés par procédure est suffisant pour obtenir des résultats pertinents pour le projet de recherche.

L'ensemble de ce projet sera réalisé dans le respect des textes réglementaires relatifs à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Ce projet de 5 ans s'inscrit dans une démarche éthique suivant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). La détermination de la distribution intratumorale de la gemcitabine nécessite la mise en place de ces modèles. L'étude statistique envisagée permet de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la validation des résultats tout en veillant à optimiser les conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux (enrichissement du milieu, visites régulières...) et en tenant compte de la sensibilité des animaux ainsi que des contraintes liées à l'espèce.

16990 Plusieurs arénavirus du nouveau monde sont à l'origine de fièvres hémorragiques comme les virus Guanarito, Machupo, Sabia, Chapare et Junin. Un vaccin existe seulement pour ce dernier alors que les autres virus sont également responsables d'émergences sporadiques avec un taux de mortalité élevé pouvant atteindre les 30%.

Une plateforme vaccinale basée sur le virus Mopéia atténué a déjà prouvé son efficacité en protégeant des macaques cynomolgus contre les virus Lassa et Machupo.

L'objectif de ce nouveau projet est de démontrer l'innocuité ainsi que l'immunogénicité d'un nouveau vaccin contre ces cinq Arénavirus pathogènes chez le macaque cynomolgus. Son efficacité contre les arénavirus sera évaluée sur les mêmes animaux dans un autre établissement pour démontrer qu'une protection est attendue contre l'ensemble des arénavirus du nouveau-monde.

Ce vaccin permettrait de proposer une prophylaxie contre tous les Arénavirus du nouveau monde et ainsi être préparé pour lutter contre l'émergence possible de l'un de ces virus à fort potentiel épidémique. La seule méthode rationnelle et pragmatique qui permet d'envisager un développement industriel d'un tel vaccin est de proposer un candidat qui permet de protéger contre l'ensemble des fièvres hémorragiques causées par les Arénavirus en Amérique du Sud.

12 macaques cynomolgus seront utilisés. Les animaux seront vaccinés (2 injections à 1 ou 2 mois d'intervalle) par injection intra-musculaire puis un suivi post-injection sera réalisé (écouvillons nasaux et buccaux + prélèvements sanguins et urinaires). Cela permettra de vérifier l'absence d'excrétion du virus vaccinal et de suivre l'évolution de la réponse immune.

La précédente immunisation réalisée avec le vaccin contre machupo a permis de démontrer la totale innocuité de ce candidat. Des résultats similaires sont attendus avec le vaccin multivalent.

L'immunogénicité ainsi que l'efficacité (contre Lassa et Machupo) de cette plateforme vaccinale a déjà été testée et validée *in vitro* et *in vivo*. Cependant, seul un test sur primates non-humains sera à même de prouver l'efficacité et l'innocuité de cette vaccination multivalente.

Le nombre d'animaux a été réduit à son minimum pour conclure quant à l'efficacité du vaccin. Il n'existe pas de modèles d'espèces inférieures capables de reproduire la physiopathogénèse et les réponses immunitaires retrouvées chez l'Homme au cours des fièvres hémorragiques, c'est pourquoi le macaque cynomolgus est utilisé ici.

Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale (+antalgique si nécessaire) pour éviter toute souffrance ou stress. De plus, des sondes de température implantables (télémétrie) seront mises en place afin de pouvoir monitorer les animaux en temps réel et donc raffiner la surveillance des animaux (pas de contention nécessaire). Les animaux seront hébergés en groupe social et bénéficient d'un programme d'enrichissement adapté.

16991 Les neutropénies congénitales sévères (NCS) constituent une famille de troubles génétiques caractérisés par un taux de neutrophiles très bas, divers dysfonctions d'organes et peuvent dans certains cas, évoluer en cancer du sang. Les neutrophiles étant des cellules clés de l'immunité, les NCS sont souvent associées à un haut risque d'infection pouvant être mortel. S'il existe aujourd'hui un traitement des NCS, son efficacité reste limitée et certains patients ne répondent pas et la seule option reste une greffe, impactant sévèrement la vie du patient.

Il existe une sous-classe de NCS, appelée maladie de Shwachman, qui est caractérisée par des symptômes spécifiques comme une dysfonction du pancréas, des anomalies du squelette et parfois, des déficits neurocognitifs. Ces patients présentent une mutation dans le gène SBDS (Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome). Récemment, une mutation dans autre gène (gène SRP54) a été identifiée chez des patients qui présentent des symptômes de la maladie de Shwachman mais sans présenter de mutation dans le SBDS.

SRP54 est une protéine essentielle à la bonne synthèse et localisation des protéines dans les cellules.

Notre groupe a généré des modèles cellulaires mutés sur un allèle du gène SRP54 mais ces modèles ne nous permettent de répondre que partiellement aux questions posées. Nos résultats préliminaires suggèrent que l'étude au niveau de l'organisme entier s'avère indispensable. Ainsi, avec des rats présentant différent type de mutation dans le gène SRP54 conduisant à l'arrêt de la synthèse de la protéine (modèle "Knock-out" ou KO) ou à la production d'une protéine modifiée (modèle "Knock-in" ou KI), nous espérons pouvoir créer un modèle permettant de comprendre d'une part, le lien entre mutations du gène et symptômes chez les patients et d'autre part comment ce défaut de SRP54 conduit à une neutropénie. Ce modèle pourrait également nous permettre de découvrir des cibles thérapeutiques non seulement pour les SNC mais également pour les très fréquentes neutropénies induites par les chimiothérapies.

L'objectif de ce projet qui utilisera 144 animaux est de maintenir les lignées de rats génétiquement modifiées pour le gène SRP54 et d'identifier si ces mutations aboutissent aux symptômes observés chez l'homme, 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 une analyse statistique pertinente. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires.

Raffiner: Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et des points limites spécifiques ont été déterminés pour éviter toute souffrance animale et justifier un arrêt de l'expérience en cours. Les procédures sont réalisées sous anesthésie ou après sacrifice et le suivi des animaux est quotidien (weekend et jours fériés inclus). Les rats sont maintenus en groupe de 2-3 par cage pour maintenir une interaction entre individus et l'environnement des cages est enrichi à l'aide de carré de cellulose et de frisure pour la construction des nids et de tunnels pour permettre aux animaux de se cacher.

Remplacement: Les données générées *in vitro* dans la littérature antérieure n'ont pas permis d'élucider clairement les différents acteurs impliqués dans la physiopathologie des neutropénies liées à SRP54. Seul le modèle animal - couplé au maximum avec des études de culture cellulaire - permettra dans notre cas de répondre à ces questions complexes.

16992 Les troubles de la mémoire peuvent être causés par des maladies neurodégénératives (telles que la maladie d'Alzheimer), des lésions cérébrales liées à un traumatisme crânien, des accidents vasculaires cérébraux ou encore l'épilepsie. Les traitements pharmacologiques associés ont une efficacité limitée, ce qui a conduit par exemple à la révocation de leur prise en charge par la sécurité sociale pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. La stimulation électrique du système nerveux, ou neurostimulation, est une approche alternative qui a montré son efficacité dans le traitement des symptômes de la maladie de Parkinson et de la douleur chronique. En outre, plusieurs essais cliniques sont en cours dans le monde pour étendre son application à d'autres troubles neurologiques, en particulier les troubles de la mémoire et la maladie d'Alzheimer. Différents groupes de recherche clinique ont montré certaines améliorations des capacités de mémoire sur des patients épileptiques implantés avec des électrodes pendant une période d'environ une semaine. En revanche, ces essais cliniques n'ont pas permis de mettre en évidence la meilleure cible thérapeutique ou les paramètres de neurostimulation optimaux pour mener à une augmentation substantielle des facultés de mémoire, en particulier en raison de l'impossibilité de déplacer les électrodes chez ces patients ou bien de tester plusieurs protocoles de neurostimulation. Afin de comprendre précisément les effets de la neurostimulation sur les structures cérébrales impliquées dans les processus mnésiques et d'en optimiser les paramètres pour améliorer les facultés de mémoire, des études pré-cliniques chez l'animal sont nécessaires. Les modèles animaux permettent en effet de positionner systématiquement les électrodes pour cibler les aires cérébrales d'intérêt, ce qui n'est pas possible chez des patients épileptiques qui reçoivent des électrodes implantées pour une raison différente, liée à leur pathologie. De nombreux travaux sur le rongeur ont permis d'étudier en détail les contributions de la formation hippocampique dans les processus de mémoire. En revanche, les modèles rongeurs restent limités pour déterminer la meilleure cible thérapeutique au niveau des réseaux cérébraux à grande échelle, qui diffèrent fortement entre les rongeurs et les primates. Ces réseaux cérébraux à grande échelle impliquent notamment le cortex préfrontal médial. Il a été démontré que les interactions entre le cortex préfrontal médial et la formation hippocampique jouent un rôle majeur dans les processus de mémoire. De plus, une altération de ces interactions est présente dans plusieurs maladies neurodégénératives et troubles neuropsychiatriques.

Le but de ce projet est de tester sur le primate non-humain des protocoles de neurostimulation affectant plusieurs aires cérébrales (en particulier la formation hippocampique et le cortex préfrontal médial) afin d'augmenter les capacités d'encodage et de récupération des informations sur une tâche de mémoire visuo-spatiale (apprentissage par association de paires). Ce protocole traite spécifiquement des tests d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) qui seront effectués sur les 10 animaux de l'étude, répartis en deux groupes d'âge. Lors de ces tests, des séquences IRM réalisées sous anesthésie permettront d'étudier la connectivité structurelle et fonctionnelle entre ces différentes aires cérébrales et d'optimiser le placement des électrodes intracérébrales pour les tests neurophysiologiques (ceux-ci font l'objet d'un autre protocole).

Les animaux seront hébergés ensemble, dans une structure spécialement agréée pour l'hébergement et l'utilisation des primates en recherche, disposant d'équipements et de protocoles adaptés au raffinement du milieu pour cette espèce (nourriture variée, jeux pour primates, fond sonore, habituation progressive à l'environnement et à la tâche, ...). Toute intervention nécessaire à l'expérimentation sur l'animal sera réalisée sous anesthésie locale ou générale et complétée par l'utilisation d'analgésiques afin d'assurer le meilleur confort qui soit. Les points limites seront respectés, ce qui nous amènera à prendre les dispositions qui s'imposent de la façon la plus précoce et la plus adaptée possible. Pour cela, tous les animaux seront surveillés plusieurs fois par jour par nos techniciens animaliers et par les chercheurs formés et habitués à interagir avec ces espèces animales. Cela permettra de discuter au cas par cas des soins à apporter à l'animal en fonction des besoins.

16993 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.

16994 L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité et la sécurité de produits cicatrisants (médicaments, dispositifs médicaux ou produits combinés) dans la cicatrisation de plaies chez le miniporc, en particulier des plaies chroniques (plaies qui sont bloquées au stade inflammatoire de la cicatrisation). Les plaies chroniques sont une problématique de santé majeure qui affecte des millions de patients dans le monde, avec une prévalence en hausse en raison du vieillissement de la population et l'épidémie de maladies métaboliques et cardiovasculaires. La réalisation des études d'évaluation de la performance des produits cicatrisants souvent associée à l'évaluation de la tolérance locale s'inscrit dans un contexte réglementaire obligatoire avant les 1ers essais cliniques chez l'homme ou la mise sur le marché. Il n'existe à l'heure actuelle pas de méthode *ex vivo* permettant d'atteindre ces objectifs. Le mini-porc est un bon modèle d'étude de la cicatrisation car la structure de la peau est proche de celle la peau de l'homme. Le projet comprend une première procédure de mise au point du modèle de cicatrisation. Cette procédure utilisera un nombre d'animaux restreint (jusqu'à 6 maximum) et permettra de valider la méthode de création des plaies. La 2ème procédure comprend l'ensemble des études d'évaluation de l'efficacité et de la sécurité à proprement parler qui pourront se faire sur différents types de produit cicatrisants : gel, pansement, patch, etc. Dans les deux procédures, les plaies seront créées après anesthésie générale de l'animal et avec une analgésie adaptée préférentiellement sur le dos et le produit de cicatrisation sera appliqué sur la plaie puis un pansement sera mis en place pour protéger

la plaie et permettre le maintien du produit au contact de la plaie. A une fréquence régulière, les pansements seront renouvelés avec une nouvelle application de produit. Des prélèvements sanguins pourront être effectués en parallèle pour suivre les paramètres hémato-biochimiques ainsi que pour faire de la pharmacocinétique. En fin d'étude, les animaux seront maintenus en vie (pour l'étude de mise au point) ou seront euthanasiés avec prélèvements des sites/organes en vue d'histopathologie (pour les études d'évaluation).

Le nombre d'animaux utilisé dans la 2ème procédure sera limité au maximum en prenant en compte le nombre de produits à tester, l'inclusion d'un éventuel produit référence, les différences attendues entre les produits, ... et est estimé à 225 sur 5 ans. Au total, le nombre d'animaux utilisé dans ce projet est estimé à 231 pour la durée du projet. Dans la mesure du possible et si cela est compatible avec les objectifs, des animaux déjà utilisés dans un projet antérieur seront utilisés. Les mini-porcs sont hébergés dans des box individuels, ils disposent d'un programme d'enrichissement avec un aménagement de leur environnement (litière pour fourrager, panier de repos, jouets, etc....) ainsi que des récompenses. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. Des points limites spécifiques et précoces seront appliqués.

16995 Dans le cadre du développement de nouvelles molécules, l'utilisation du modèle animal s'avère encore nécessaire, notamment pour les pathologies humaines qui font intervenir des systèmes de régulation complexe.

Dans ce projet, nous souhaitons mettre en place au sein de notre institut un nouveau modèle d'induction de l'hypertension cardiaque, dans le modèle souris.

Cette approche nous permettra d'étudier le rôle de certaines protéines, mais aussi l'efficacité de traitements luttant contre l'hypertension.

Ces animaux recevront des pompes miniatures, implantées sous la peau, qui diffuseront un ensemble de molécules qui déclencheront l'apparition d'une hypertension d'origine cardiaque.

Nous maîtrisons déjà la méthode d'implantation de ces pompes, et souhaitons obtenir des données de base sur la fonction cardiaque après cette induction pharmacologique, ainsi que sur les dommages tissulaires en résultant.

Cette étude pilote s'écoulera sur une période de 28 jours de traitement durant laquelle les animaux seront étroitement surveillés, avec notamment une échographie et une électrocardiogramme.

Le modèle Souris nous permet d'accéder à des animaux génétiquement modifiés, permettant d'étudier l'ensemble des fonctions d'une protéine au sein d'un organisme complet adulte.

Il s'agit d'une approche très utile pour déterminer la fonction d'une protéine dans un organisme vivant et ainsi orienter le développement de nouveaux médicaments.

Chaque groupe expérimental sera constitué de 10 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 20 souris pour ce protocole, comparant des animaux dans des conditions physiologiques ou avec une hypertension.

REPLACEMENT : nous ne disposons pas d'une autre possibilité d'étudier la fonction d'une protéine dans un organisme vivant 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 le protocole pharmacologique n'entraîne 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 molécules 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.

16996 Dans l'organisme, les artères et les veines peuvent être le lieu d'une thrombose, c'est à dire le lieu de formation d'un caillot de sang au sein du vaisseau. Les conséquences de ces thromboses sont importantes et peuvent mettre en jeu la vie des personnes.

Les médicaments antiplaquetaires sont généralement utilisés dans le traitement de la thrombose artérielle. Ils ont permis de réduire considérablement la survenue d'accidents cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral. Malheureusement, l'utilisation de telles substances peut provoquer des risques de saignement chez les patients. Nos collaborateurs ont développé un agent dirigé contre un récepteur des plaquettes qui inhibe la thrombose artérielle chez la souris et le singe sans entraîner de risque hémorragique. Cette molécule a été testée chez l'homme : elle présente une bonne tolérance et fait l'objet d'une étude clinique chez des patients présentant un accident vasculaire cérébral.

Parallèlement, d'autres études ont démontré la participation active des plaquettes dans la thrombose veineuse. Le risque majeur chez ces personnes est le devenir des caillots formés au niveau des veines, pouvant se loger au niveau des poumons et provoquer une embolie pulmonaire.

L'objectif de cette étude est de visualiser, en imagerie nucléaire par tomographie par émission de positons (TEP), dans un modèle de thrombose veineuse induite chez la souris, l'évolution de la formation du thrombus dans les vaisseaux sanguins suite à l'administration de deux traitements pharmacologiques à visée anti-plaquettaire (ACT.017 et/ou Actilyse) . Le caillot sanguin sera visualisé par l'injection par voie intraveineuse d'un anticorps anti-fibrine radiomarké au cuivre 64 et au zirconium 64, qui permettra de suivre l'évolution du thrombus sur 72h maximum chez un même animal.

Réduction : Le modèle de thrombose veineuse présente l'avantage d'être extrêmement facile à mettre en œuvre et a déjà été publié. Ceci permet d'éviter toute mise au point utilisant des animaux supplémentaires. De plus, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe sera le plus petit possible, soit 8, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons un test Kruskal-Wallis pour comparer les différents groupes avec un post-test de Dunn.

Ces choix permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Raffinement : Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- des 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, contrôle des cycles jours/nuits, de la température et de l'hydrométrie),

- une observation quotidienne des animaux par du personnel compétent, une gestion de la douleur suivant une grille d'observation et de points limites adaptés à l'étude. Si les points limites définis dans cette saisine sont atteints, les procédures expérimentales seront interrompues afin de réduire la souffrance induite à l'animale,

- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C tout au long de la procédure afin lutter contre l'hypothermie. De même lors des séances d'imagerie les animaux sont anesthésiés, placés dans une ambiance chauffée et leurs signes vitaux monitorés en continu.

Remplacement : Il est impossible de reproduire la thrombose veineuse *in vitro* en raison de sa complexité. En effet le risque hémorragique dépend des interactions entre les vaisseaux et la composition du sang. En conséquence, nous proposons d'utiliser un modèle de thrombose veineuse chez la souris

Nous utiliserons au maximum 170 souris pour mener à bien ce projet.

16997 Une réaction inflammatoire est une réaction de défense du corps à une agression externe comme une infection, un trauma, une brûlure ou une allergie. Elle fait intervenir principalement les cellules immunitaires (globules blancs) et des protéines circulantes, comme des anticorps par exemple. Outre les globules blancs, les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel lors d'une inflammation. En effet,

les plaquettes, dont le rôle est avant tout d'assurer l'arrêt du saignement en cas de rupture d'un vaisseau, ont un rôle prépondérant et bénéfique dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation. Ce rôle fait intervenir deux récepteurs présents sur les plaquettes qui appartiennent à la famille des récepteurs à domaine ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) activateur des plaquettes. Le troisième membre de cette famille est le récepteur FcγRIIa, encore appelé CD32A. C'est un récepteur pour les anticorps IgG, présent sur les plaquettes, mais uniquement d'origine humaine. Les plaquettes sanguines des souris, en particulier, n'expriment pas de récepteurs aux immunoglobulines. Or, la stimulation de ce récepteur entraîne une activation forte des plaquettes humaines, ou des souris transgéniques exprimant ce récepteur. Il est ainsi légitime de se demander si la présence du CD32A sur les plaquettes de souris intervient lui aussi dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation.

Les mécanismes cellulaires participant au développement de l'inflammation sont complexes, aussi leur compréhension requiert des explorations expérimentales complémentaires *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux. Ainsi, le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation, a été mis en évidence chez la souris, à l'aide d'un modèle expérimental de réaction inflammatoire cutanée. Nous étudierons le rôle du CD32A dans cette réaction à l'aide de souris transgéniques « humanisées », c'est-à-dire exprimant la protéine CD32A d'origine humaine. Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire en conditions inflammatoires.

Limitation du nombre d'animaux:

Le nombre d'animaux utilisé lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 6 souris/groupe pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Raffiner :

Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état ; les animaux sont hébergés dans des cages (3 souris/cage) individuellement ventilées contenant un nid en coton compressé et de la frisure de papier Krafft afin de leur permettre d'exprimer leur comportement de nidification naturel et de d'organiser leur environnement;
- les expériences sur animaux vigile auront une durée limitée dans le temps ;
- pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel expérimenté.
- des points limites ont été établis permettant de soustraire l'animal à la souffrance.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur souris seront remplacées par des études *in vitro* sur cellules

Cette étude nécessitera l'utilisation de 436 souris.

16998 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 thérapeutiques 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 tumorigénicité, de migration et d'invasion cellulaires *in vitro* qui permettent d'effectuer une première sélection de molécules en fonction de leur efficacité, 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)

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 680 souris sur une période de 5 ans pour permettre l'évaluation de l'efficacité de molécules pharmaceutiques ayant une indication anti-cancéreuse.

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 6 à 8 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, en proposant l'exploration du développement tumoral par imagerie non-invasive, est de permettre (i) une détection précoce des tumeurs (avant qu'elles ne soient palpables), (ii) le suivi de la progression tumorale au cours du temps (croissance / invasion / dissémination), et (iii) la quantification 2D et/ou 3D des masses tumorales (tumeurs primaires et métastases). Une approche quantitative de l'évaluation de l'efficacité médicamenteuse dans le modèle animal sera abordée par le développement d'outils logiciels pour l'analyse d'images, visant à établir des biomarqueurs quantitatifs d'imagerie, c'est-à-dire des signaux anatomiques, physiologiques, biochimiques ou moléculaires détectables en imagerie, pour améliorer le développement thérapeutique contre cette pathologie grave.

16999 La formation des étudiants dans le domaine de la Biologie à l'Université comporte des séances d'initiations pratiques, considérées comme indispensables en complément des enseignements magistraux. La présente demande concerne la formation d'étudiants en Licence de Biochimie, Biologie Cellulaire et Physiologie et en Master de Physiologie, Neurosciences et Comportement et en Master Métiers de l'Enseignement, Education et Formation (Capes et Agrégation en Sciences de la Vie et de la Terre). Les étudiants à l'issue de ces diplômes sont susceptibles d'intégrer directement, sans formation complémentaire, des emplois professionnels requérant ces compétences pratiques.

Au niveau de la Licence, les animaux étudiés sont des grenouilles (*Rana esculenta*). Elles sont acquises auprès d'un fournisseur agréé localisé à côté de l'Université. Les achats de grenouilles se font avant chaque séance de TP, directement chez le fournisseur. Les grenouilles, en nombre correspondant aux nécessités de chaque séance, sont apportées dans un aquarium jusqu'à la salle d'enseignement spécialisé par l'Enseignant (Titulaire d'une autorisation d'expérimenter sur l'animal vivant, niveau I) et mis à mort par ce même Enseignant selon les normes en vigueur : percussion céphalique, suivie d'une préparation cérébro-spinale (Destruction des centres nerveux encéphaliques et médullaires). Selon les séances, le programme concerne alors des études myographiques, cardiographiques, neurophysiologiques. Les dissections, préparations, expérimentations sont réalisées par les étudiants sous la supervision de l'enseignant. Les étudiants travaillent par groupes de deux ce qui permet de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Le nombre total de grenouilles utilisées (100 sur une année) a été fortement réduit en comparaison avec les années précédentes grâce au remplacement de certains TP par des méthodes substitutives. Les séances conservées le sont car les objectifs pédagogiques recherchés ne peuvent pas être atteints par des méthodes d'apprentissages substitutives.

Au niveau du Master, les animaux étudiés sont des souris (Swiss souche OF1) acquises auprès d'un fournisseur agréé et hébergées dans la Plateforme « Animalerie centrale » UFR Santé UBFC-FC. Les souris, en nombre correspondant aux nécessités de chaque séance, sont apportées dans l'annexe de l'Animalerie (niveau 1) par l'Enseignant (Titulaire d'une autorisation d'expérimenter sur l'animal vivant, niveau I). Les étudiants travaillent par groupe ce qui permet de limiter le nombre d'animaux utilisés

(total de 50 pour l'année). Les Travaux Pratiques concernent l'observation et la quantification du comportement spontané des souris dans des enceintes de tests usuels (« Open-field », labyrinthes, actimètre) et la respirométrie (Volume d'air consommé estimé par EXAO). Les étudiants doivent manipuler les animaux sous la surveillance de l'enseignant et quantifier des comportements (Locomotion, défécation et miction, toilettage, « rearing ») pendant la durée de présence des animaux dans l'enceinte de tests (5 minutes en règle générale). Les mêmes animaux peuvent être observés plusieurs fois dans différents tests. A l'issue des observations comportementales, les animaux sont mis à mort (CO₂) excepté 4 souris qui seront euthanasiées par injection létale de Doléthal® puis perfusées afin de récupérer leurs cerveaux qui seront utilisés lors de TP d'Histologie. Au niveau des Masters, quelques séances de travaux pratiques concernent aussi des grenouilles selon des procédures identiques à celles décrites ci-dessus pour la Licence (total de 30 grenouilles par an).

Au total, 130 Grenouilles et 50 Souris seront utilisées par an, soit 650 grenouilles et 250 souris pour 5 ans (durée du projet). Soit un total de 900 animaux pour le projet.

17000 Cette de Demande d'Autorisation de Projet fait suite à la DAP précédemment acceptée (N° APAFIS#17268 ; N° de dossier : 2018102509097577). Le but de cette première étude était d'évaluer l'impact d'un traitement sur la récupération fonctionnelle chez le rat juvénile. Le précédent et le présent projet se basent principalement sur le fait que l'accident vasculaire cérébral (AVC) provoque une hypoexcitabilité dans le cortex moteur du péri-infarctus et ceci en raison d'une activité accrue des neurones GABAergiques. Alors que cette inhibition chroniquement élevée dans la région du péri-infarctus peut avoir un effet neuroprotecteur sur l'AVC, elle peut antagoniser la récupération fonctionnelle par la suite. Certains travaux ont montré que le modulateur allostérique négatif GABA $\alpha 5$ (NAM) était capable de réduire cette inhibition tonique excessive et d'inverser les déficits moteurs induits par les AVC chez les rongeurs. L'effet de cette « molécule X » a déjà été évalué sur la récupération fonctionnelle post-AVC chez plusieurs modèles de rongeurs adultes. Les résultats ont montré que cette « molécule X » à une concentration 10-15 mg/kg réduisait le déficit sensorimoteur induit par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) permanente lorsque le traitement est administré de manière chronique à partir de 3 jours post-AVC. Cet effet bénéfique était maintenu après 14 jours de traitement. Ce traitement a également amélioré la cognition chez les souris et les rats soumis à une occlusion transitoire de l'ACM. Sur la base de cette justification scientifique, la « molécule X » est actuellement évaluée sur la récupération fonctionnelle chez des patients adultes post-AVC dans un essai clinique de phase IIb.

Dans la population pédiatrique, l'AVC touche 500 à 1000 enfants chaque année en France, ce qui justifie le fait de devoir établir une nouvelle stratégie thérapeutique. L'amélioration de la récupération fonctionnelle post-AVC potentiellement fourni par ce traitement s'appliquerait aux enfants ayant atteint une maturation et une stabilité acceptable du système GABAergique (plus de 6 ans).

La première étape de ce projet consistait en la validation du modèle chirurgical chez le jeune rat. Nous n'avions pas pris en compte que le rat juvénile de 28 jours possédait une récupération post-chirurgicale, pour ce modèle d'AVC, moindre par rapport aux rats adultes. De plus, en respectant scrupuleusement nos points limites décrits dans la première DAP et en se souciant grandement du bien-être animal, nous avons obtenu un taux de mortalité et d'exclusion supérieur à nos attentes. Pour cette étape de validation, nous avons utilisé près de 80% des animaux inclus dans ce précédent projet (n=108 sur un total de 137 animaux demandés dans la DAP d'origine). Nous avons utilisé les animaux restant pour commencer l'étape 2, étude pharmacologique (n=29).

Nous proposons maintenant une seconde demande afin de pouvoir compléter nos groupes expérimentaux et ainsi finaliser ce projet (n=83 rats juvéniles pour finaliser le projet initial).

De plus, l'obtention des premiers résultats montre que la « molécule X » est prometteuse. Au vue de nos premiers résultats très encourageants, l'industriel souhaiterait intégrer 2 étapes supplémentaires à ce projet (n=112 rats de 28 jours + 68 rats adultes de 12 semaines, n animaux total pour ce projet = 263). La première étape supplémentaire permettra de contrôler la méthode d'administration initialement prévue (voie orale) à l'administration intrapéritonéale chez le rat juvénile. La seconde étape

supplémentaire permettra quant à elle de comparer les effets de la « molécule X » en injection orale chez le rat adulte et donc permettre la validation de ces résultats.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'administration chronique de 3 doses de ce traitement sur la récupération sensorimotrice et cognitive liés à ce modèle.

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). Notre projet correspond à l'étape de validation *in vivo* d'une stratégie thérapeutique, qui fait suite aux validations réalisées *in vitro*. Aucun modèle informatique permettant de modéliser de tels mécanismes n'est à ce jour disponible. Ainsi, l'étude de la récupération fonctionnelle post-AVC 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. Dans un but de raffinement, 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 de ce modèle chez l'animal adulte permettra de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés (n=195 rats juvénile + 69 rats adultes de 12 semaines).

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.

17001 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, un anticorps dirigé contre la protéine Claudine-1 (CLDN1) a été développé. 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 un modèle de souris greffée avec des cellules de CHC humain (Huh 7). 2 lignées de Huh7 seront utilisées résistantes ou non au Sorafenib. L'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. Nous testerons également les effets de la protonthérapie seule ou en association avec l'anticorps anti-Claudine-1 et le Sorafenib. La protonthérapie est efficace pour traiter certaines tumeurs solides et présente l'avantage, par rapport à la radiothérapie, de déposer des doses plus importantes précisément dans la tumeur en limitant les dommages des tissus sains environnants. De plus, il a été montré que certaines chimiothérapies pouvaient potentialiser la radiothérapie comme c'est le cas du Cisplatine dans le traitement de certains cancers ORL. Cependant, rien n'a encore été démontré sur la potentialisation de la protonthérapie. Afin de pouvoir étudier un effet de potentialisation de la protonthérapie par le Sorafenib, nous souhaitons tester cette combinaison dans ce modèle murin. Différentes doses de protonthérapies seront testées.

Le suivi du développement tumoral et de l'effet des thérapies sera évalué lors d'études longitudinales *in vivo* par imagerie à tomographie par émission de positons (TEP) à l'aide de différents radio-traceurs permettant de suivre plusieurs paramètres physiologique de la tumeur (apoptose, prolifération...)

970 souris seront utilisées dans ce protocole de recherche.

Cette étude respectera la règle des 3R :

Remplacer : des études *in vitro* sur des lignées cellulaires et *ex vivo* sur des biopsies de patients atteints de CHC avec ces anticorps anti- CLDN1 ont montré leur efficacité à ralentir la croissance tumorale. La complexité du développement tumoral (circulation sanguine, environnement tumoral) ne pouvant être

étudié uniquement sur des cellules en culture, il est primordial de tester ces anticorps sur des modèles animaux greffés avec des cellules tumorales humaines.

Réduire : le nombre d'animaux dans chaque groupe a été calculé afin d'inclure le minimum d'animaux pour pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus. Un test statistique de Mann Whitney sera utilisé pour analyser les groupes d'animaux.

Raffiner : l'environnement des animaux est enrichi (tunnel, carré de coton déchiquetable pour maintenir une activité locomotrice), les animaux sont placés à plusieurs par cage. L'eau et la nourriture sont fournis ad libitum et la température et l'hygrométrie des pièces de stabulation contrôlées. Les souris greffées auront un suivi quotidien réalisé par du personnel préalablement formé et à l'aide d'une grille d'observation adaptée afin d'éviter toute souffrance liée au développement des tumeurs et tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, analgésie).

17002 Les addictions comportementales qui incluent notamment le jeu pathologique et la boulimie, sont un problème de société et de santé publique grandissant. D'un point de vue psychologique, il a été observé que, quel que soit l'expression de l'addiction comportementale, elle est toujours associée au développement d'une forte impulsivité, caractérisée par une incapacité forte à attendre. D'un point de vue neurobiologique, les mécanismes sous-tendant ces troubles restent inconnus, limitant ainsi le développement de thérapies pour guérir de cette maladie psychiatrique. L'on sait cependant que des traitements qui stimulent la transmission de la dopamine, un neurotransmetteur impliqué dans le développement des addictions aux drogues, augmente le risque d'apparition d'une addiction comportementale d'un facteur dix. Il a pu d'ailleurs être montré que ces mêmes traitements augmentaient bien l'impulsivité chez le rat, ainsi que l'augmentation dans certaines zones du cerveau d'un complexe protéique appelé mTORC1, complexe qui a déjà été impliqué dans les addictions aux drogues.

L'objectif du présent projet est donc de mieux comprendre et de confirmer l'implication du complexe protéique mTORC1 dans les comportements impulsifs et d'addictions, afin de fournir à terme, une cible possible pour le traitement de ces troubles.

Le projet est composé de 4 procédures expérimentales et requerra au total un maximum de 80 rats sur 5 ans.

Réduction : ce nombre a été déterminé de manière à utiliser le minimum d'animaux sans compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement : ce projet implique de la neurochirurgie et certaines tâches comportementales de classe modérée. La chirurgie 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 et de définir précisément les points limites adaptés. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Remplacement : Le projet nécessitant l'étude du comportement et de circuits cérébraux intégrés et complexes, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

17003 Les dysfonctions temporomandibulaires sont des myo-arthropathies de l'appareil manducateur, responsables dans la plupart des cas de symptômes douloureux chroniques. Il s'agit de la première cause de douleurs orofaciales dans le monde représentant 5 à 12% de la population dans les pays industrialisés. Il existe des formes musculaires et des formes articulaires. Dans les formes articulaires, après échec du traitement conservateur, les modalités du traitement sont souvent mini-invasives, passant par le lavage articulaire (arthrocentèse ou arthroscopie) et/ou l'injection intra-articulaire de substances diverses telles que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les corticostéroïdes ou l'acide hyaluronique, qui soulagent la douleur et améliorent l'ouverture buccale. Il n'existe à l'heure actuelle pas de substance injectable associant les avantages d'un visco-supplément et d'une substance pharmacologiquement active. D'autre part, les substances pharmacologiques actuellement utilisées

souffrent de l'absence d'effets prolongés (pour les anti-inflammatoires non stéroïdiens) ou de conséquences locales néfastes en induisant une déminéralisation osseuse (pour les corticoïdes). Nous proposons le développement d'un hydrogel avec système de libération prolongé permettant d'incorporer une substance pharmacologique pour pallier à ces problématiques.

Le modèle utilisé ici est le rat Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). 15 rats recevront lors d'une première phase une injection intra-articulaire d'un nouvel hydrogel sans médicament anti-inflammatoire ou antalgique associé pour vérifier la compatibilité du matériau avec le tissu articulaire. Deux groupes de 25 rats recevront une injection dans l'articulation temporomandibulaire avec de l'iodoacetate monosodique ou de collagenase de type II afin de créer une ostéoarthrose stable et reproductible. Le modèle le plus adapté sera choisi pour évaluer notre nouvelle méthode thérapeutique, un nouveau gel avec substance pharmacologique active, tel qu'un AINS, la kétamine, ou un anticorps anti TNF- α . Les mesures comportementales (et en particuliers le test du retrait de la tête avec un anesthésiomètre de Von Frey), la prise alimentaire et l'évolution du poids permettront d'évaluer l'efficacité de traitement. Une analyse histologique avec un test ELISA évaluant les cytokines pro-inflammatoires complémentaires sera réalisée pour comprendre le mécanisme d'effet du traitement. 200 rats seront utilisés sur 5 ans.

Afin de respecter la règle des "3R",

Réduire: Appliquer les stratégies de « test intégré », qui consistent en des tests en étape, effectués en commençant par une partie des animaux et par une évaluation et une prise de décision « arrêt » ou « poursuite » à chaque étape. Une phase de biocompatibilité de 15 rats est mise en place en préalable. Une évaluation de deux méthodes afin d'obtenir un modèle d'ostéoarthrose compatible avec notre question est mise en place. Un calcul du nombre de sujet nécessaire a été effectué pour tester les groupes thérapeutiques. 9 groupes thérapeutiques ou témoins sont nécessaires à tester.

Remplacer: Pas de technique *in vitro* disponible. La méthode chimique est comparativement aux méthodes mécaniques et chirurgicales la moins contraignante pour l'animal tout en permettant de répondre à la question. Néanmoins, une caractérisation physicochimique *in vitro* et une étude de culture cellulaire seront effectuées pour sélectionner le matériel le plus efficace à tester chez l'animal.

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 des injections. Au cours de l'étude, les rats seront observés et surveillés de près chaque jour à l'égard du bien-être animal. Dans le cas nécessaire, la décision de sacrifice sera prise et réalisée avant que les animaux souffrent.

17004 Les Coronavirus sont des virus à ARN qui circulent dans un grand nombre d'espèces animales. Quatre coronavirus humains endémiques sont apparus depuis ces 18 dernières années provoquant des épidémies plus ou moins importantes. La plus récente due au SARS-CoV-2 est devenue une pandémie provoquant une maladie, la COVID-19, aux symptômes très variés et pouvant mener à une détresse respiratoire grave. Sans vaccin encore disponible et pour éviter une évolution vers des cas graves, la recherche d'un médicament antiviral est indispensable.

La culture cellulaire n'étant pas un modèle suffisamment proche de ce qui se passe au sein d'un individu infecté, le recours à l'animal est nécessaire. Nous ne testerons *in vivo* que les principaux antiviraux qui auront déjà prouvé leur action *in vitro*.

Deux procédures expérimentales seront nécessaires afin de déterminer les conditions de traitement optimales pour atteindre l'effet antiviral souhaité – la dose, la durée d'exposition incluant un prétraitement ou non mais aussi la durée d'infection virale. Toutes les expériences seront réalisées chez des souris femelles de 10 à 12 semaines, modèle déjà décrit pour ce genre d'étude. Un maximum de 10 antiviraux sera testé par an et requerra un maximum de 3720 souris sur 5 ans réparties dans deux procédures de sévérité légère. Nos études statistiques nous ont permis de réduire le nombre de souris utilisées au minimum. Nous surveillerons le poids et l'état général des souris quotidiennement (jusqu'à 4 jours maximum selon les données recueillies lors de la procédure expérimentale 1), et mettrons à mort les souris qui atteindraient le point limite que nous avons fixé a priori. Les souris seront mises à mort avant le prélèvement des organes pour déterminer la charge virale. Au final, ce projet permettra de déterminer les antiviraux les plus efficaces contre le SARS-CoV-2 qui menace la

population mondiale. Les résultats seront partagés avec la communauté scientifique pour accélérer les études sur des moyens de lutte efficaces.

17005 La trisomie 21 ou syndrome de Down est une maladie grave caractérisée par la triplication de tout ou partie du chromosome 21. La trisomie 21 est la première cause de retard mental d'origine génétique affectant 60 millions de personnes dans le monde. Découvrir une thérapie pouvant atténuer les déficits intellectuels, notamment cognitifs, est donc un enjeu de santé publique.

Le but de notre projet de recherche est d'ordre préclinique en utilisant un modèle animal. Des modèles du syndrome de Down ont été développés chez la souris et la lignée Ts65Dn est, à ce jour, la plus étudiée car ces souris ont une triplication de chromosomes (équivalent au chromosome 21), sont viables avec un développement non dommageable, et présentent des caractéristiques proches des symptômes observés chez les individus atteints de trisomie 21. Notamment, les souris Ts65Dn sont caractérisées par des déficits cognitifs (différents types de mémoire et apparition précoce de la maladie d'Alzheimer) et psychomoteurs.

Des données scientifiques proposent comme cible potentielle pour le traitement de ces symptômes, bien qu'inexplorée à ce jour, le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1). Notre laboratoire a développé une banque de composés synthétiques innovants permettant de moduler l'activité de ces récepteurs CB1. Après avoir testé certains de ces composés sur la capacité à diminuer les déficits mnésiques des souris Ts65Dn, un composé a été sélectionné pour un développement préclinique afin d'étudier son efficacité contre les symptômes cognitifs de la trisomie 21, qui pourra servir de base à une utilisation future chez l'homme.

L'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation de 624 souris sur 5 ans.

Ce projet se fera dans le respect des règles des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement) :

(1) Remplacement : Ce projet s'applique à des comportements intégrés. Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* et donc de méthode alternative à l'utilisation des animaux. De plus, l'organisation du système nerveux central de la souris est assez proche de celle de l'homme, ce qui permettra une extrapolation à l'homme des résultats obtenus dans le projet de recherche.

(2) Réduction et raffinement : les procédures expérimentales seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, il a été précédemment démontré que le composé testé dans ce projet est non toxique (dans des modèles cellulaires et animaux). Dans un souci de respect du R de réduire, nous utiliserons au maximum 12 animaux par groupe, ce qui permettra de pouvoir faire des analyses statistiques cohérentes et le maximum sera fait pour utiliser les mêmes animaux dans plusieurs procédures.

Aussi, dans le respect du R de raffiner, les procédures expérimentales utilisées seront peu invasives (et donc ne nécessiteront pas l'utilisation d'anesthésiques ou d'antalgiques). Les souris seront hébergées dans une pièce dédiée, avec régulation de température, d'humidité et de luminosité. Un enrichissement sera placé dans les cages d'hébergement pour que les souris fassent leur nid; de plus les cages seront transparentes et rapprochées les unes des autres pour favoriser les contacts visuels et olfactifs. Les souris seront hébergées en cage collective, et seront mises en cage individuelle seulement pour les procédures qui nécessitent ce type d'hébergement.

Enfin, pour réaliser un suivi du bien-être des animaux, il y aura une observation quotidienne des animaux et des points limites ainsi que des critères d'arrêt seront définis pour chaque procédure. Si nécessaire, une modification du protocole adaptée à l'état de l'animal sera mise en place, comme par exemple des traitements appropriés (anti-inflammatoire, anti-douleur) selon l'avis du vétérinaire.

17006 La maladie rénale chronique chez le chat (MRC) survient fréquemment chez les animaux âgés et représente la pathologie rénale la plus fréquente. Elle est définie par des anomalies au niveau fonctionnel et/ou structurel de l'un ou des deux reins présentes depuis plus de 3 mois environ (définition officielle). Les dommages au niveau des reins peuvent être détectés soit directement (prélèvement/biopsie/imagerie) ou indirectement par le biais de marqueurs spécifiques dans le sang ou les urines (le ratio urine/protéine/créatinine UPC). La gravité de la pathologie varie considérablement en fonction de l'état pathologique des reins. La MRC occasionne une perte irréversible et graduelle de

la fonction rénale (plusieurs stades progressifs). L'incidence estimée de la MRC dans la population générale des chiens et des chats est de 0,5%. Les thérapies déployées ne permettent que de réduire les conséquences cliniques et physiopathologiques de la fonction rénale. Elles ne permettent pas d'arrêter, inverser ou éliminer les lésions rénales responsable de la MRC.

Le rôle de facteurs de croissance, notamment le CTGF (Connective Tissue Growth Factor), a été démontré dans l'induction d'une Fibrose Rénale responsable de la MRC. En effet, leur surexpression induit entre autre une multiplication des fibroblastes ce qui entraîne une inflammation qui favorise la progression vers un dysfonctionnement de l'organe qui conduit à la MRC.

L'objectif de cette étude est d'évaluer dans un modèle murin (souris femelles âgées de 8 à 12 semaines) la réponse humorale (anticorps) induite par des administrations répétées (2 ou 5 fois en fonction de la voie d'administration) d'un candidat vaccin véhiculé dans des particules pseudo-virales et exprimant les épitopes de la molécule cible impliquée (facteur de croissance, CGTF) dans le processus de fibrose responsable de la MRC. Cette étude ne comporte qu'une seule procédure. Elle est d'une sévérité légère.

Cette étude préliminaire dans un modèle murin, contribuera à évaluer l'ampleur de la réponse anticorps induite par ses nouveaux candidats vaccins. Des essais cliniques seront à déployer par la suite chez l'animal cible (chat) en fonction des résultats obtenus dans cette procédure.

L'absence d'un modèle *in vitro* pertinent permettant de reproduire les interactions candidat vaccin/réponse immunitaire de l'hôte, nous oblige à recourir aux modèles animaux. Les modèles murins sont prédictifs de la réponse potentielle de l'animal cible (chat).

Les souris vaccinées seront examinées quotidiennement ce qui permettra d'établir un score clinique qui sera établi en fonction de l'observation de plusieurs paramètres: poids, comportement, posture. Les animaux seront susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse légère et de courte durée, sans incidence significative sur le bien-être ou l'état général des animaux. Toutefois, en cas d'atteinte du point limité déterminé a priori, les animaux seront mis à mort.

Nous utiliserons des souris âgées de 7 à 8 semaines ayant un système immunitaire compétent.

Jusqu'à 80 souris seront utilisées sur 2 ans (le nombre minimal d'animaux à inclure pour pouvoir appliquer des tests statistiques pour petits échantillons a été déterminé en collaboration avec des biostatisticiens).

17007 La majorité des maladies infectieuses émergentes dans le monde sont des maladies virales transmises par les insectes dont beaucoup sont des zoonoses. Les arboviroses d'importance médicale qui sont plus précisément liées à ce projet sont le Chikungunya, le virus Mayaro, le virus de la rivière Ross et potentiellement d'autres virus du genre Alphavirus de la famille des Togaviridae. Ces arbovirus sont susceptibles de provoquer des arthrites aiguës et chroniques d'où leur nom d'Alphavirus arthritogènes. Ils sont largement distribués dans le monde et provoquent périodiquement des épidémies explosives. Il n'y a pas à l'heure actuelle de vaccins et les approches thérapeutiques sont balbutiantes. Nous souhaitons donc, en l'absence de systèmes *in vitro* capables de reproduire la maladie humaine, utiliser des modèles animaux dans le but de mieux les caractériser et d'améliorer la prise en charge de la maladie chez l'homme. L'infection expérimentale chez la souris offre des possibilités d'étude exploratoire sur la transmission de ces pathogènes et sur la compréhension des mécanismes de pathogénicité virale, ce qui permettra de développer des approches curatives ou préventives.

Les souris seront testées pour leur sensibilité à l'infection par les arbovirus. Leur réactivité immunologique vis à vis d'antigènes viraux natifs ou recombinés sera également déterminée. Cette méthode d'exploration reste indispensable à l'étude des arbovirus d'importance médicale dans une perspective de mise au point de prophylaxie (vaccins par exemple), d'outils de diagnostic (sérologie par exemple) et de traitements antiviraux (molécules inhibitrices des arbovirus par exemple) efficaces au bénéfice des populations humaines concernées. Ce projet se définira donc en 5 procédures de sévérité modérée. La procédure 1 consistera à définir les conditions permettant d'observer des symptômes similaires à ceux observés chez l'homme en variant les lignées de souris, les doses de virus, les voies d'injection. Dans le cadre de la deuxième procédure, nous nous intéresserons à la compétence vectorielle des principales espèces de vecteurs (nous étudierons l'infection des souris

avec les moustiques) et au potentiel de transmission du virus des souris infectées aux insectes vecteurs sains afin de mimer le cycle naturel des arbovirus. Au cours de la procédure 3, les molécules antivirales seront testées sur le modèle le plus pertinent défini en procédures 1 et 2. La procédure 4 consistera à tester l'effet d'anticorps monoclonaux et polyclonaux sur la pathologie induite par ces arbovirus et la procédure 5 consistera à tester différents candidats vaccins en se basant sur un modèle d'infection pertinent défini dans les procédures 1 et/ou 2. Sur la période de 5 années, il est prévu qu'environ 10672 souris soient utilisées dans le cadre de l'exploration de 4 arbovirus émergents.

Des procédures de raffinement seront utilisées afin de garantir le confort des animaux. Les souris infectées manifestant des signes d'inconfort, de stress ou de douleur seront surveillées régulièrement et mises à mort dès l'apparition des points limites qui ont été définis lors d'expériences précédentes et selon deux grilles d'évaluation validées par la structure du bien-être animal. Il est prévu de suivre l'état de santé des souris de façon régulière, notamment dans les procédures incluant des animaux immunodéprimés ce qui permettra de détecter précocement tout signe de souffrance et l'atteinte éventuelle des points limites. De la nourriture semi-liquide sera mise à disposition des souris en cas de prostration ou dès lors qu'une gêne même légère à la motricité sera observée. La douleur et le stress seront pris en compte par l'utilisation d'anesthésie lors de l'infection et d'antalgiques en cas de douleur. Le nombre d'animaux de cette étude a été réduit au minimum nécessaire pour réaliser des tests statistiques adaptés aux petits échantillons et à la mise en évidence d'effets forts.

17008 Le glioblastome est la tumeur cérébrale de mauvais pronostic la plus fréquente. Le glioblastome touche 1 personne sur 30 000 par an en France. Cette maladie est dans la très grande majorité des cas sporadique, sans facteur génétique retrouvé. Il s'agit d'une tumeur développée aux dépens des cellules gliales du cerveau, c'est-à-dire des cellules qui entourent, nourrissent et protègent les neurones. Le traitement de référence comprend la chirurgie quand elle est possible, la radiothérapie et la chimiothérapie par temozolomide. Malgré cela, la survie reste faible et est de 27% à 2 ans et de 9,8% à 5 ans. De nouvelles voies thérapeutiques sont donc absolument nécessaires pour améliorer le pronostic des patients.

D'autres composés que les chimiothérapies cytotoxiques peuvent être envisagés pour potentialiser la radiothérapie. L'objectif de ce travail est d'utiliser un composé du métabolisme qui s'accumule spécifiquement dans les cellules tumorales. Chez l'homme, ce composé est utilisé pour la chirurgie du glioblastome permettant une meilleure visualisation de la tumeur, et une meilleure résection. Des données scientifiques *in vitro*, et *in vivo* sur d'autres modèles montrent qu'il existe une radiosensibilisation des cellules tumorales lors de son administration. Dès lors qu'il existe une accumulation préférentielle du composé dans les cellules tumorales, et une augmentation de la toxicité de la radiothérapie associée à cette accumulation, il paraît raisonnable de penser que l'administration de ce composé va rendre la radiothérapie plus toxique sur la tumeur que sur les tissus sains et permettre une amélioration du traitement du glioblastome.

Une attention particulière sera accordée à la règle des 3R :

Remplacer : L'objectif des expériences proposées ici est de se rapprocher au maximum des conditions précliniques avant d'envisager un traitement chez l'homme. Des études *in vitro* ont été réalisées avec les cellules de glioblastome de patients afin de remplacer au possible l'utilisation d'animaux pour répondre à certaines questions spécifiques à ce projet. Cependant, seul un modèle *in vivo* permettra de vérifier notre hypothèse mise en avant *in vitro*. Ainsi, il est proposé, sur des souris dans lesquelles auront été implantées dans le cerveau des cellules tumorales de glioblastomes dérivées de patient, de tester la radiothérapie sans et avec ce composé pour observer la différence d'efficacité entre ces 2 traitements.

Réduire : Nous utiliserons le minimum nécessaire d'animaux pour être statistiquement significatifs et scientifiquement irréprochables. De plus, nous utiliserons les animaux mâles et femelles ce qui réduit de 50% l'utilisation des animaux. Nous utiliserons au total 248 souris.

Raffiner : Afin de respecter la notion de raffinement et éliminer ou réduire toute douleur, souffrance ou angoisse, leur bien-être et leur souffrance seront pris en compte quotidiennement de leur naissance à leur mort et évalués par le personnel zootechnique expérimenté. Les souris seront anesthésiées et

nursées pendant toutes les procédures invasives, y compris la radiothérapie, pour des raisons techniques d'immobilité des animaux permettant une délivrance plus précise de la dose. La progression tumorale intra-cérébrale sera surveillée de façon non invasive et les animaux seront sacrifiés aux points limites. De plus, les animaux seront hébergés en fratrie dans une cage contenant un dôme ou une plateforme rouge des du cocoon (enrichissement).

Ces expériences sont un pré-requis indispensable et suffisant pour pouvoir proposer ce traitement dans des essais de phase 1 chez l'homme, le composé étant actuellement utilisé en soin courant dans les services de neurochirurgie.

17009 Il est connu que les états cérébraux, qui se caractérisent par une activité cérébrale distribuée dans l'espace et le temps de façon particulière et reproductible, modulent notre perception du monde. Par exemple, l'état de sommeil profond nous coupe radicalement de l'extérieur, alors que des phases de sommeil plus léger nous rendent plus sensibles à notre environnement (le bruit ou la lumière peuvent ultimement nous réveiller). De même, le niveau d'anesthésie module notre perception sensorielle (notamment, l'absence de douleur). En condition pathologique, le fait de réaliser une crise d'épilepsie change l'état cérébral et ne permet pas de réagir de façon adéquate à des stimulations. Par exemple, lors d'une crise d'épilepsie-absence, le patient donne l'impression d'être dans la lune car il ne réagit pas à des demandes d'interactions. Tous ces états cérébraux normaux et pathologiques se caractérisent par des signatures d'activité des neurones que l'on peut aisément identifier en les enregistrant avec une technique d'électrophysiologie comme l'électroencéphalographie (EEG). La question posée dans ce projet est de comprendre comment un changement d'état cérébral entraîne une modification de la perception sensorielle. Notre hypothèse est que la modification des seuils de décharge des neurones impliqués lors du changement d'état entraîne une modification de la transmission du signal neuronal à l'échelle du réseau cérébral et donc une modification de la façon dont les régions cérébrales se coordonnent pour traiter une information de façon distribuée.

Notre objectif principal est de réaliser des stimulations sensorielles (auditif, somatosensoriel, visuel) chez un rat épileptique et de recueillir l'activité du cerveau dans son ensemble (IRM fonctionnelle) pendant et en dehors des crises dans le but de mesurer comment le traitement de l'information est impacté lors du changement d'état cérébral. Les états cérébraux (pendant les crises versus en dehors des crises) seront identifiés grâce à un enregistrement EEG simultané à l'IRM fonctionnelle.

Nous utiliserons un maximum de 172 rats sur 5 ans.

Réduction : le nombre d'animaux nécessaire à cette étude 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. Les animaux épileptiques pourront être utilisés comme leurs propres contrôles sachant que cette étude vise à comparer différents états cérébraux chez un même animal. Les animaux contrôle permettront d'obtenir une évaluation de la situation physiologique, anatomique et fonctionnelle chez un animal sain, qui n'a jamais fait de crises. En effet, on ne peut pas exclure une modification des réseaux cérébraux sous l'impact des crises chez l'animal épileptique, entraînant de ce fait une modification du traitement de l'information sensorielle même en dehors des crises.

Raffinement : les animaux sont manipulés et suivis quotidiennement afin de réduire tout stress 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).

Remplacement : Aucun modèle *in vitro* ni computationnel ne permet d'atteindre les objectifs fixés notamment avoir une vision globale de la transmission d'information sensorielles naturelles sur le cerveau entier.

17010 Les myopathies centronucléaires sont des maladies génétiques qui causent des faiblesses musculaires, une force diminuée et des difficultés respiratoires. Ces symptômes peuvent apparaître dès la plus jeune enfance et ce jusqu' 'à l'âge adulte à des degrés de sévérités variables; cette variabilité est encore mal comprise et est toujours en cours d'investigation. Les myopathies centronucléaires peuvent être causées par différentes mutations génétiques mais les mécanismes qui relient ces mutations aux symptômes sont encore mal connus. Au sein de notre équipe, nous possédons déjà quelques modèles souris mimiquant une forme légère et une forme grave de ces myopathies; cependant, beaucoup d'aspects des mécanismes et de la progression de la maladie restent à élucider malgré les avancées obtenues. Dans cet objectif, l'étude d'un modèle souris porteur d'une mutation responsable d'un phénotype intermédiaire pour ces myopathies centronucléaires a été généré. Le premier objectif de ce projet est donc d'évaluer si ce modèle souris reproduit fidèlement cette forme de la maladie. Le deuxième objectif de ce projet sera de proposer une approche thérapeutique pour ce modèle souris. Le but ultime de ce projet sera de proposer et de fournir des informations et des données sur cette maladie afin de pouvoir les prendre en considération pour une éventuelle thérapie dans des essais cliniques sur les patients.

Seul le modèle animal (souris) permettra d'étudier d'une part la physiologie et d'autre part l'amélioration des symptômes de la maladie (REPLACEMENT)

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'étude, plusieurs procédures expérimentales seront réalisées sur une même souris. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante; un nombre maximum de 10 souris par groupe seront nécessaires (REDUCTION)

Les myopathies sont des maladies qui affectent les muscles, pouvant entraîner diverses difficultés ; afin de s'assurer que les animaux ne souffrent pas, ils seront surveillés quotidiennement. En cas de difficulté de déplacement dans la cage, de la nourriture gélatinisée sera rajoutée dans la cage pour permettre à la souris de se nourrir correctement. Les souris seront anesthésiées pour la plupart des PE afin d'éviter toute souffrance. Nous utiliserons aussi de l'ocrygel pour la PE3 afin d'éviter tout inconfort des yeux ainsi qu'un tapis chauffant pour éviter tout inconfort au réveil après l'anesthésie. 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, 159 souris seront nécessaires.

17011 1- Intitulé du projet: Etude des mécanismes centraux responsables du maintien de l'éveil en utilisant des modèles souris transgénique.

2- Durée du projet: 60 mois

3- Mots-clés: Eveil, sommeil, troubles du sommeil, thérapie, modèles animaux

4- Finalité du projet: Recherche fondamentale

5- Objectifs et bénéfices escomptés du projet

L'être humain est soumis à l'alternance du cycle veille-sommeil. L'éveil est un état comportemental permettant la réalisation d'activités diverses. Le sommeil lent est un état comportemental de repos, au cours duquel l'absence d'activité motrice permet à l'organisme d'assurer la récupération physique et fonctionnelle dans des conditions de dépense énergétique minimale. Le sommeil paradoxal quant à lui, constitue le 3ème état du cerveau permettant la mise en scène des rêves et la consolidation de nos caractéristiques génétiques, physiologiques et psychologiques.

Le sommeil a ses propres pathologies. Ses troubles affectent la santé et la qualité de vie et de la population générale (~37% en France). Depuis de nombreuses années, nos recherches consistent à identifier les mécanismes centraux responsables du maintien de l'éveil et leurs troubles, comme la narcolepsie, une affection neurologique caractérisée par une somnolence excessive, un déficit du maintien de l'éveil et par la cataplexie, une perte brusque du tonus musculaire souvent provoqué par l'émotion. Deux médicaments actuellement utilisés en médecine du sommeil ont été identifiés par notre groupe.

Ce projet consiste, dans la poursuite de nos travaux, à préciser le rôle encore méconnu de deux neurotransmetteurs majeurs dans le cerveau, l'histamine et l'orexine, dans différents contextes comportementaux pendant l'éveil. L'étude recourt à des molécules médicamenteuses ayant des effets sur les systèmes d'éveil du cerveau et plus généralement les différents états de veille-sommeil.

Nous espérons pouvoir réaliser grâce à ce projet la caractérisation préclinique de ces molécules et de leurs dérivés ce qui permettra de décrypter les mécanismes neuronaux sous-jacents et, à plus long terme, la réalisation d'essais cliniques.

6- Nuisances prévues

Le protocole expérimental implique l'utilisation de souris transgéniques et comprend une implantation non-douloureuse d'électrodes corticales et musculaires sous anesthésie générale, des enregistrements continus de sommeil, des administrations orales de substances pharmacologiques et des tests comportementaux en nombre limité et avec un temps de récupération suffisant entre chaque.

Chaque animal ne sera soumis qu'à une seule chirurgie d'une durée d'1h environ qui consiste à réaliser une incision cutanée/sous-cutanée permettant d'exposer le crâne afin de fixer des électrodes sur celui-ci. La douleur, le stress et l'inconfort associés sont pris en charge par l'anesthésie générale et locale et par l'utilisation d'analgésiques et d'anti-inflammatoires de sorte que les animaux ne présentent pas d'anomalie clinique ou psychologique pendant et après la chirurgie. Condition essentielle à cette étude du sommeil, la santé et le bien-être des animaux sont particulièrement surveillés tout au long du projet. Nous veillons notamment à ce que les souris bénéficient d'un maximum de confort, d'un environnement enrichi et de contacts sociaux pendant toute la durée du projet.

Ce projet prévoit l'utilisation de souris au nombre de 160 au total, dans une seule procédure expérimentale de gravité modérée. Tous les animaux sont euthanasiés de façon éthique en fin d'expérience. Se devenir est justifié par la nécessité de prélever le cerveau afin de procéder à la vérification histologique de l'emplacement des électrodes et aux études histochimiques.

7- Application de la règle des « trois R »

Dans le but d'avoir des résultats scientifiques les plus fiables et les plus reproductibles possibles, notre projet répond au maximum aux exigences des « 3R »:

1. Remplacement : En l'état actuel des connaissances il n'existe pas d'alternative satisfaisante à l'utilisation d'animaux pour l'étude des mécanismes neurophysiologiques régulant le cycle veille-sommeil-rêve, c'est pourquoi nous devons recourir à des études chez l'animal entier. Les mammifères sont les seuls animaux possédant un cycle veille-sommeil-rêve semblable à celui de l'homme. La souris présente en outre des rythmes circadiens très marqués, variables selon le patrimoine génétique et avec l'environnement et constitue le modèle animal le plus indiqué de notre projet. Son utilisation devrait permettre la mise au point de nouvelles thérapies pour lutter contre les différents troubles du sommeil et de l'éveil. Notre objectif est aussi que l'acquisition de données physiologiques-pharmacologiques *in vivo*, aujourd'hui indispensable, contribue ultérieurement à la création de modèles numériques complexes du sommeil pouvant remplacer de façon satisfaisante l'utilisation de l'animal.

2. Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum pour atteindre l'objectif du projet qui est de caractériser le cycle veille/sommeil de nos souris génétiquement modifiées et de les comparer à celui de souris normales. Le fait que chaque souris est utilisée non seulement comme son propre témoin mais aussi pour un même test à plusieurs reprises, et pour plusieurs tests permet de réduire considérablement ce nombre à 160 animaux issus de notre production. Ce nombre d'animaux est nécessaire car nous allons étudier plusieurs lignées génétiquement modifiées sur lesquelles nous devons réaliser différents tests comportementaux/pharmacologiques.

3. Raffinement : Les études sur le sommeil nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques. Le bien-être des animaux est donc une condition sine qua non de chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, inflammation, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Un protocole progressif permet aux animaux de s'acclimater et de s'habituer à l'ensemble des conditions expérimentales. L'implantation d'électrodes est réalisée sous anesthésie générale/locale avec des traitements analgésique/anti-inflammatoire appropriés. Après la chirurgie les

animaux sont au repos pendant 2 semaines suivies d'une semaine d'habitation, leur bien-être est surveillé quotidiennement. Durant les enregistrements de sommeil l'animal est relié au dispositif par un câble mais demeure libre de ses mouvements. Les administrations pharmacologiques sont réalisées par voie orale plutôt que par injection. De plus, le contact social entre les souris est préservé au maximum pendant toute la durée d'expérimentation. Tous les raffinements mis en œuvre dans ce projet seront décrits dans nos publications en vue d'une diffusion au sein de la communauté scientifique.

17012 La Sclérose Tubéreuse de Bourneville (TSC) est une maladie génétique liée à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les enfants atteints peuvent développer des lésions dans plusieurs tissus dont le cerveau provoquant des désordres neurologiques tels que l'épilepsie. L'épilepsie touche environ 500 000 personnes en France. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que 50 millions de personnes en sont atteintes dans le monde (données 2012).

L'épilepsie se traduit par des « crises » qui se déclenchent suite à une activité excessive du cerveau. Les médicaments actuels sont inefficaces chez 30 à 40 % des patients, c'est pourquoi la recherche se bat sur tous les fronts pour améliorer la prise en charge de la pathologie.

L'étude du modèle murin de la TSC ciblé dans le cerveau en conditions physiologiques et physiopathologiques est justifié car il n'existe pas d'autres modèles *in vivo* qui récapitulent les désordres neurologiques très prononcés dans cette maladie. Le cerveau présente une organisation architecturale complexe. A l'heure actuelle, aucun modèle cellulaire ne permet cependant de modéliser fidèlement le cerveau et le recours à des modèles murins transgéniques demeure nécessaire.

Au total cette procédure nécessitera un maximum de 320 souris à phénotype dommageable sur une durée de 5 ans. Pour ce faire un modèle de souris de l'épilepsie sera développé et nécessitera des procédures chirurgicales.

Le principe des 3R sera respecté.

L'analyse de paramètres multiples par souris et l'utilisation de tests statistiques adaptés permettront de réduire le nombre de souris utilisées à son minimum.

Le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins sera respecté par l'emploi de points limites précoces entraînant la mise à mort des animaux.

Toute procédure douloureuse ressentie par les souris entraînant une douleur, une souffrance ou une angoisse sera effectuée sous anesthésie et associée à un analgésique pour prévenir les effets pré, per et post-opératoires. Pour assurer le bien-être des animaux, les souris bénéficieront d'un enrichissement constitué de coton et de « maisons » en carton. Les souris seront sous surveillance journalière.

Les points limites ont été établis, entraînant l'interruption de la procédure en cours et la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme ce projet permettra de mieux comprendre et traiter la TSC par :

1) L'établissement d'un modèle murin pertinent aux atteintes cérébrales de la TSC pour permettre la compréhension des mécanismes génétiques responsables du développement de malformations corticales.

2) L'identification de cibles responsables de la pathologie.

3) Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patients réfractaires aux traitements actuels.

17013 La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie respiratoire chronique invalidante et très fréquente (3,5 millions de sujets adultes de plus de 40 ans en France). Cette pathologie respiratoire, caractérisée par un trouble ventilatoire obstructif non réversible, recouvre trois entités : la bronchiolite chronique obstructive, la bronchite chronique et l'emphysème. Elle conduit à une insuffisance respiratoire chronique sévère. Une inflammation et un remodelage tissulaire des bronches distales et des alvéoles pulmonaires sont les déterminants majeurs du déclin progressif de la fonction respiratoire.

Le principal facteur étiologique de la BPCO est le tabagisme ; cependant, il est désormais bien établi que certains facteurs professionnels sont à l'origine de la survenue ou de l'aggravation de la BPCO

avec une fraction attribuable estimée à 15%. L'exposition pulmonaire à des aérosols particuliers complexes de silice (SiO₂), notamment dans le secteur du bâtiment et des travaux publics (BTP) ou de l'industrie d'extraction minière est l'un des facteurs étiologiques potentiellement incriminé dans la littérature. Parallèlement, des inquiétudes subsistent de façon générale quant aux effets potentiels sur la santé respiratoire des particules de taille nanométrique appelées « nanoparticules » (NP). Ces NPs représentent une fraction importante dans certains aérosols particuliers en milieu professionnel qu'ils soient produits de façon intentionnelle ou non intentionnelle ; dans ce dernier cas, les NPs sont alors appelées « particules ultrafines ». Dans la littérature, de très rares publications suggèrent que l'inhalation de particules de SiO₂ à de très fortes doses (environ 1g/kg) engendrerait une altération des petites voies aériennes et de l'emphysème chez le rat. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'études expérimentales montrant des effets respiratoires des particules de SiO₂ à des doses réalistes représentatives de celles retrouvées en milieu de travail. Nous émettons donc l'hypothèse que des NPs de SiO₂ à des doses réalistes pourraient engendrer ou aggraver une BPCO.

Cette présente demande d'autorisation est l'actualisation d'une demande antérieure concernant les effets respiratoires chez la souris d'expositions pulmonaires répétées à des NPs de SiO₂ seules ou présentes dans des aérosols particuliers.

Cette précédente demande faisait suite à un projet concernant effets respiratoires chez la souris d'expositions pulmonaires répétées à des NPs d'oxydes métalliques issues de fumées de soudage.

L'objectif de ce projet est de compléter un projet précédemment accepté en étudiant les effets pulmonaires chez la souris d'expositions pulmonaires répétées à des particules minérales fines et ultrafines de SiO₂ seules retrouvées dans le secteur professionnel du BTP, comme par exemple dans le sable, le ciment, le béton, la brique ou les poussières de démolition. Des souris seront donc exposées par voie respiratoire à des particules fines et ultrafines de SiO₂ seules. Une étude dose-réponse à des expositions répétées de particules fines et ultrafines de SiO₂ seules permettra de déterminer, d'une part, à partir de quel niveau de dose apparaît un risque de développer ou d'aggraver une BPCO et, d'autre part, d'apporter des arguments pour affiner les valeurs limites d'exposition professionnelle aux poussières dans le secteur du BTP et à la silice chez l'Homme. Pour répondre à l'objectif, des prélèvements pulmonaires seront réalisés après la mise à mort des animaux en vue de réaliser des analyses histologiques, morphométriques, minéralogiques (notamment en microscopie électronique couplé à un EDX) et biologiques (cellularité, expression protéique et génétique, notamment de l'inflammation et de la fibrose pulmonaire).

Afin de respecter la règle des "3R", le projet prévoit le recours à : - un nombre d'animaux aussi réduit que possible : 297 souris au total. Ce nombre d'animaux est nécessaire pour étudier chaque groupe et chaque temps d'exposition (1jour à 6mois) et pour répondre à l'objectif de l'étude. - un modèle animal ne pouvant pas être actuellement remplacé par des tests alternatifs pour l'étude des effets à explorer dans ce projet. - une méthodologie comportant des critères d'interruption, comme il suit : Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences. Le poids sera mesuré tous les 3 jours. Afin d'enrichir le milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton, et des bouts de bois. En cas d'apparition d'un ou plusieurs signes de souffrance (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer...), l'animal sera mis à mort par inhalation de CO₂ dans une chambre spécifique.

17014 Notre projet de recherche en cancérologie consiste à traiter par radiothérapie interne vectorisée (RIV) des tumeurs greffées chez la souris dans la perspective d'une application clinique innovante. La RIV est une forme de radiothérapie qui consiste à administrer aux individus des molécules spécifiquement dirigées contre les cellules tumorales et préalablement couplées à des atomes radioactifs. Ces molécules peuvent être des anticorps monoclonaux (Acms). Ces dernières vont sélectivement reconnaître et cibler des récepteurs exprimés par les cellules tumorales qui seront ainsi irradiées de façon spécifique et détruites, alors que les tissus sains non reconnus par l'anticorps radiomarqué seront épargnés. On parle dans ce cas de radioimmunothérapie (RIT). La RIT présente une alternative intéressante dans les situations où la radiothérapie externe conventionnelle ne peut pas être utilisée c'est-à-dire dans le cas de tumeurs diffuses ou proches d'organes à risques. Elle se rapproche de la chimiothérapie classique mais elle présente l'avantage d'un ciblage des cellules tumorales que n'offre pas la chimiothérapie. Elle trouve un de ses champs d'application dans le traitement des tumeurs

diffuses dans le péritoine développé à la suite de cancer de l'ovaire ou du colon par exemple (carcinomes péritonéaux) mais également d'autres pathologies comme le mélanome pour lesquelles des anticorps thérapeutiques ont été développés.

Le projet que nous portons consistera à évaluer l'efficacité anti-tumorale d'anticorps radiomarqués à l'aide de radionucléides émetteurs d'électrons Auger, de particules alpha ou bêta, dans des modèles de carcinomes péritonéaux (principalement d'origine ovarienne ou colorectale) et dans un modèle de mélanome.

Dans ce projet, la règle des 3R sera respectée (directive 2010/63). Pour cela, le nombre d'animaux sera réduit au mieux : 2638 souris au total sur 5 ans. Nos protocoles seront raffinés; une surveillance quotidienne sera effectuée pour détecter très rapidement tout signe de morbidité et nous procéderons à des soins adaptés ou à l'euthanasie en dernier recours. Le remplacement par des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico* n'est malheureusement pas envisageable dans ce type de thérapie du cancer qui utilise des radiopharmaceutiques et met également en jeu le système immunitaire de l'animal. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales.

Nous disposons des installations et équipements nécessaires à la manipulation de sources radioactives et des dispositifs visant à assurer la radioprotection des personnes et locaux.

17015 Le diabète (élévation du taux de sucre dans le sang) est à l'origine de la formation anormale de vaisseaux sanguins (processus d'angiogenèse) pouvant avoir de graves conséquences sur la santé. Ces anomalies conduisent en effet à des atteintes de l'œil (rétinopathie) et du rein (néphropathie), ainsi qu'à des problèmes de perfusion des tissus situés aux extrémités (au niveau du pied notamment). A ce jour, il n'existe pas de traitement satisfaisant pour améliorer ces complications qui atteignent entre 20 et 60% des patients diabétiques, selon l'organe touché. La protéine que nous étudions est présente dans les vaisseaux et est connue pour agir sur l'angiogenèse. Un projet précédent a permis de mettre en évidence une part de responsabilité de cette protéine dans le développement de l'atteinte rénale associée au diabète. Ces travaux doivent cependant être complétés et ont pour objectif complémentaire de déterminer par quel mécanisme notre protéine d'intérêt agit et pourrait être une cible à visée thérapeutique. A l'aide d'un modèle de diabète de type 1 (absence de production d'insuline) et de différentes lignées de souris transgéniques, nous évaluerons quel type de cellules est déterminant pour la production de cette protéine et si son action est liée à celle d'un facteur de croissance spécifique. Le diabète sera induit par injections intrapéritonéales répétées (5 au total) d'une substance chimique sur les souris vigiles. Un mois après, le débit sanguin dans l'artère rénale sera mesuré par échographie sous anesthésie. Un groupe de souris sera euthanasié pour les analyses des reins et de leur fonction tandis que dans un autre groupe de souris, le diabète sera suivi pendant 4 mois. Ces animaux subiront alors une procédure chirurgicale sous anesthésie et analgésie afin de reproduire une complication vasculaire liée au diabète qui est à l'origine de problèmes de claudication et de l'apparition d'ulcères. Ils seront euthanasiés pour analyses au plus tard 14 jours après chirurgie. Ce projet a été élaboré en respectant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Afin d'atteindre les objectifs, le recours aux animaux est indispensable. En effet, la néphropathie diabétique met en jeu des mécanismes intégrés et pluricellulaires ne pouvant être reproduits *in vitro*. Ce projet nécessite 360 souris sur une période de 3 ans. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, un même groupe pouvant permettre d'évaluer l'atteinte rénale et la vascularisation. 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. Tout au long du projet, les souris seront suivies 2 fois par semaine selon des critères spécifiques avec des points limites évalués à l'aide d'une grille de score pour éviter toute souffrance. En cas de douleur, l'administration d'antalgique et d'analgésie sera réalisée. Si la douleur persiste, l'animal sera euthanasié. Le soin et le suivi des animaux seront faits par des personnes compétentes et expérimentées. Les animaux seront maintenus sans isolement et avec enrichissement, les cages seront changées avec une fréquence accrue pour éviter que les souris diabétiques, qui urinent beaucoup plus que les non diabétiques soient dans l'humidité.

17016 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 (composés toxiques pour l'oreille interne). 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.

Le présent projet propose de tester chez le rongeur, le potentiel bénéfique d'un composé pharmacologique le SK-01 sur les déficits posturo-locomoteurs induits par une atteinte vestibulaire unilatérale. Des lésions vestibulaires de nature ototoxique seront générées chez le rat adulte par administration transtympanique d'arsanilate (TTA). Un total de 192 rats adultes mâles sera nécessaire pour atteindre les objectifs de ce projet qui se résument à 1/ évaluer l'effet antivertigineux du composé SK-01 en déterminant les doses et les fenêtres thérapeutiques les plus efficaces 2/ comprendre son mode d'action.

Afin de répondre à la règle des 3R : 1/ Réduction : Nous avons mené au préalable une analyse statistique via le logiciel G-Power afin de déterminer le nombre d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement exploitables et fiables. Les différentes procédures seront réalisées sur les mêmes animaux, réduisant ainsi le nombre total de rats à utiliser pour cette étude. 2/ Raffinement : Une période d'acclimatation d'une semaine sera appliquée avant le début des tests. La TTA sera réalisée sous anesthésie à l'isoflurane et la température des animaux sera contrôlée tout le long de la procédure. Les animaux seront 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 énergie et seront hébergés dans des cages enrichies. L'enrichissement se constitue de plaques de cellulose ainsi que des petites briques de bois. Les plaques de cellulose permettent de solliciter l'instinct de l'animal à nidifier préservant ainsi une activité et un exercice naturel tandis que les briques de bois lui permettent de satisfaire son instinct naturel à ronger et macher. 3/ Remplacement : Aucun test *in silico* ne peut à l'heure actuelle se substituer aux tests sur modèles animaux de désordres vestibulaires.

Les données recueillies au cours de cette étude serviront de base aux études précliniques réglementaires qui conditionneront un éventuel passage en clinique du composé SK-01 comme médicament candidat contre les symptômes des désordres vestibulaires.

17017 Ce projet constitue la suite d'un projet qui nous a permis d'identifier des gènes possiblement impliqués dans la Maladie d'Alzheimer. Pour déterminer si ces gènes peuvent représenter des cibles thérapeutiques, il est nécessaire d'en modifier l'expression et de déterminer si cette manipulation influence la progression de la pathologie.

Pour moduler l'expression des gènes, il est possible d'utiliser des virus modifiés. L'avantage d'utiliser des virus est que ces derniers peuvent être employés chez des animaux sauvages, évitant donc d'avoir à générer de nouveaux animaux génétiquement modifiés. Différents types de virus existent qui permettent de modifier l'expression des gènes d'intérêt dans des types cellulaires particuliers. Dans le cerveau, les virus peuvent être administrés soit directement dans la zone d'intérêt soit par l'administration dans les ventricules. Dans le premier cas, l'expression du gène d'intérêt est plus restreinte que dans le second cas où elle est plus ciblée.

L'objectif de ce projet pilote est de comparer différents virus pour chacune des deux voies d'administration afin de déterminer la stratégie la plus adaptée (i.e. une stratégie s'entend comme la combinaison d'un virus et d'une voie d'administration). Dans cette étude, nous testerons 20 stratégies

différentes (10 virus, et 2 voies d'administration). Pour chacune des stratégies 3-4 souris seront injectées. En tenant compte des animaux contrôles (animaux opérés mais non injectés), nous utiliserons donc entre 80 et 100 souris.

Le projet a été établi pour prendre en compte la règle des 3R. La comparaison de différentes stratégies permettra de déterminer les avantages et inconvénients de chacune. Les résultats seront utiles pour le projet mentionné (gènes d'intérêt dans la maladie d'Alzheimer) mais aussi d'autres projets de notre équipe et de notre institut, conduisant in fine à la réduction du nombre d'animaux utilisés. Le protocole d'administration des virus requière une chirurgie peu invasive qui sera réalisée sous anesthésie gazeuse pour faciliter le réveil des animaux. Durant la chirurgie et en phase post-opératoire les animaux recevront un traitement anti-inflammatoire afin de limiter la souffrance due à la chirurgie. Dans la phase post-opératoire, les animaux seront surveillés pour évaluer leur souffrance éventuelle grâce à une grille d'analyse déjà existante. En cas d'atteinte des points limites (prostration, arrêt d'alimentation, poils ébouriffé, perte de poids >15%), l'animal sera euthanasié. Nos recherches dans le domaine de la maladie d'Alzheimer se focalisent sur les cellules non-neuronales du cerveau. Ces cellules sont extrêmement sensibles à leur environnement et leurs fonctions sont considérablement altérées lorsqu'elles sont utilisées en culture. Pour être pertinente, la modification des cibles doit donc être réalisée sur animal vivant. De plus, cette étude est requise dans la mesure où les données bibliographiques concernant le ciblage de certains sous-types de cellules non-neuronales restent très parcellaires.

17018 Nous menons des recherches sur des maladies génétiques congénitales caractérisées par une faiblesse musculaire très handicapante, voire mortelle, afin de comprendre leur origine et trouver des traitements, aujourd'hui inexistant, pour les soigner. Ce projet concerne des myopathies qui résultent du fonctionnement anormal d'une protéine qui est exprimée par les muscles et qui est nécessaire pour que ce dernier se contracte en réponse au nerf. Nous utilisons majoritairement des modèles cellulaires pour identifier des molécules qui stimulent le fonctionnement de cette protéine et qui pourraient servir de médicaments contre ces maladies génétiques. Cependant il n'est pas possible de répondre totalement à la première règle des 3 R, qui est de remplacer, pour mener à bien nos travaux car le muscle adulte ne peut pas être reproduit en culture, tout comme l'interaction entre le nerf et le muscle. Aussi, des modèles animaux de ces maladies génétiques sont nécessaires pour valider l'effet bénéfique des molécules sélectionnées en culture. Nous avons choisi le poisson zèbre car il permet de répondre au mieux aux deux autres règles des 3R pour le criblage de molécules pharmacologiques à moyenne échelle : il permet de réduire le nombre d'animaux et de raffiner les expériences menées car ses conditions d'hébergement et de manipulation sont de plus en plus normalisées, et les connaissances que l'on a de sa physiologie et de sa génétique sont importantes.

La première procédure consiste à obtenir des poissons souffrant d'une faiblesse musculaire en réponse à une mutation induite dans la protéine qui nous intéresse, ce qui nécessite d'évaluer le dommage ainsi induit chez les larves et les poissons par observation. Les procédures suivantes consistent à évaluer la force musculaire des larves et des poissons contrôles ou mutants par étude de leurs performances de nage et de leur consommation d'oxygène pendant la nage à différents âges (larves de 4 à 6 jours, juvéniles de 2 mois, adultes de 6 mois à 18 mois). Nous évaluerons la nage spontanée et induite par la lumière des larves sur 1h00 à l'aide d'équipements commerciaux et de protocoles standardisés. Leur consommation d'oxygène au repos et pendant la nage sera mesurée dans un bac hermétique. La nage et la consommation d'oxygène des poissons juvéniles et adultes seront évaluées sur 16 mois dans un tunnel de nage (expérience d'environ 16h00 réalisée à l'âge de 2 mois, 6 mois, 12 mois et 18 mois menée à l'aide d'un équipement commercial avec des protocoles standardisés). Ces protocoles standardisés sont conçus de manière à limiter au maximum leur impact sur les animaux. Les gestes contraignants (manipulation des poissons) seront réalisés le moins souvent possible et après anesthésie légère (juvéniles et adultes), et des temps d'acclimatation seront aménagés.

Un effectif total de 5030 animaux (4300 larves et 730 poissons) est nécessaire et suffisant pour permettre d'obtenir des résultats scientifiquement robustes. Le nombre d'individus à utiliser a été réduit le plus possible mais calculé pour obtenir des résultats statistiquement significatifs selon les règles de transmission génétique.

17019 Les mutations du gène SPG11 provoquent la forme la plus courante de paraplégie spastique héréditaire récessive autosomique (HSP), caractérisée par un trouble de la marche associé à diverses altérations cérébrales. Les mutations de ce même gène sont également responsables de formes rares de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) et de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) juvénile progressive. La souris Spg11 knockout développe des troubles moteurs et des déficits cognitifs précoces. Cette souris Spg11 knockout récapitule l'ensemble des symptômes associés aux mutations du gène SPG11 observées chez les patients atteints de HSP, de SLA et de CMT. Ce projet a pour objectif d'évaluer l'effet de candidats-médicaments sur la réversion des symptômes associés à cette maladie dans ce modèle murin génétiquement modifié de HSP.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 1200 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 étudier l'impact d'un gène sur un organisme dans sa globalité. A 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 : Le raffinement sera obtenu par la mise au point de procédures rigoureuses, un suivi quotidien de l'état de santé des animaux, le suivi des signes cliniques, la familiarisation des animaux aux procédures expérimentales et la détermination des points limites.

Dans ce projet, le raffinement sera également obtenu par une surveillance accrue des animaux :

Les souris Spg11^{-/-} ne présentent pas de caractéristiques dysmorphiques ou d'anomalies avant l'âge de huit mois par rapport à des souris témoin de la même portée. A 16 mois, la plupart des souris knockout présentent une posture anormale avec des membres postérieurs écartés, une élévation pelvienne inférieure et une cyphose prononcée de la colonne thoracique. Dans les études prévues, les animaux seront âgés de 12 semaines à la fin des études. Dans le cas de l'utilisation d'animaux plus âgés, le raffinement sera également obtenu par une surveillance accrue des animaux avec un accès à l'eau et à la nourriture facilité pour palier la faiblesse musculaire. Les souris seront surveillées quotidiennement ; le niveau de douleur et de paralysie est déterminé à l'aide d'une échelle d'évaluation spécifique à l'espèce et à la pathologie. Les mesures appropriées seront prises pour réduire tout inconfort ou toute douleur qui se développerait (par exemple: traitement par un analgésique).

17020 1-Contexte scientifique du projet

Le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer dans le monde. Alors que la chirurgie et la radiothérapie sont utilisées pour traiter le cancer du poumon à un stade précoce, les patients atteints d'une maladie métastatique non opérable reçoivent souvent une combinaison de chimiothérapies. Malheureusement, les tumeurs deviennent fréquemment résistantes, ce qui entraîne des rechutes et une faible survie des patients. L'immunothérapie permet de détruire les cellules cancéreuses en utilisant le propre système de défense immunitaire du patient (lymphocytes T). Ces nouvelles approches ont conduit à des résultats spectaculaires de rémission durable de tumeurs solides (mélanome et cancer du poumon principalement). Toutefois, cette stratégie thérapeutique fonctionne chez un nombre limité de patients (30% environ), incitant à étudier et comprendre les éléments contrôlant l'immunité anti-tumorale. Une caractéristique fréquemment observée chez les patients ne répondant pas aux immunothérapies est l'accumulation des lymphocytes T au contact des fibroblastes associés aux tumeurs (CAF) et non au contact des cellules cancéreuses.

2-Objectifs du projet

- L'objectif de ce projet est d'étudier *in vivo* dans des modèles de tumeur chez la souris, les interactions entre les CAF et les lymphocytes T et de proposer des approches thérapeutiques ciblant les CAF afin d'augmenter l'efficacité des immunothérapies. Pour cela nous avons choisi des modèles murins de tumeurs intra-pulmonaires ou intra-mammaires qui permettent d'étudier les interactions entre les cellules tumorales pulmonaires ou mammaires avec le microenvironnement d'origine (fibroblastique et

immunitaire). Cette recherche fondamentale devrait déboucher sur des applications cliniques en proposant des thérapies innovantes ciblant les CAF

3-Balance dommages/bénéfices

- Les dommages causés aux animaux (implantation des cellules tumorales sous anesthésie et caractérisation des lymphocytes T et CAF au cours de la croissance tumorale) sont réduits au maximum grâce à un suivi quotidien du bien-être des souris, une mesure 1 fois par semaine des tumeurs intrapulmonaires par imagerie et 2 fois par semaine au pied à coulisse pour les tumeurs intramammaires. Une définition de points limites prédictifs et suffisamment précoces permet d'éviter la survenue de douleur.

- Les retombées à venir et les bénéfices attendus de ce projet sont importants car l'identification de cibles pour manipuler les CAF et ainsi libérer les lymphocytes T permettrait de guérir un nombre plus important de patients par immunothérapie.

4-Conformité avec la règle des 3R

Remplacer : - Des études préliminaires *ex vivo* sur des prélèvements de cancer du poumon humain ont démontré le rationnel de ce projet. Des cultures *in vitro* de cellules tumorales/fibroblastes de souris sont réalisés en parallèle. Mais l'introduction de lymphocytes T dans ces cultures reste problématique du fait de l'absence de vascularisation.

- Seul un modèle *in vivo* permet de modéliser toutes les interactions cellulaires et d'apprécier l'efficacité des traitements.

Réduire : - Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 552 souris pour 5 ans.

- Le nombre de souris par groupe a été défini a minima tout en permettant une puissance statistique suffisante pour conclure (N=6/groupe). Afin d'apprécier la reproductibilité des résultats obtenus l'expérience sera répétée une fois avec le même nombre d'animaux par groupe.

- Une expérience pilote permettra de sélectionner le meilleur modèle et seul ce modèle sera utilisé dans les procédures suivantes.

Raffiner : - Les souris sont manipulées sans stress par des personnels compétents. Le bien être des souris sera suivi quotidiennement et les tumeurs seront mesurées 2x/semaine pour les tumeurs intramammaires sous cutanées et une fois par semaine par imagerie pour les tumeurs pulmonaires. Les points limites conduisant à l'euthanasie des souris seront précoces et prédictifs pour l'apparition d'une douleur. Les souris seront alors euthanasiées.

- Une anesthésie générale sera réalisée pour les injections de cellules tumorales intrapulmonaires afin de limiter le stress et la douleur des animaux.

17021 Les virus à ARN enveloppés et membres du genre flavivirus (famille Flaviviridae) sont transmis majoritairement par les moustiques du genre *Aedes*. Ces virus représentent des enjeux majeurs en termes de santé publique, notamment les arbovirus dengue (DENV de type 1 à 4), Zika (ZIKV) et fièvre jaune (YFV). Ces virus sont capables de se répliquer dans le système nerveux central chez l'Homme et/ou dans différents modèles animaux ce qui entraîne divers troubles neurologiques. De façon intéressante, les petites protéines M de ces virus (80 acides aminés) qui sont ancrées à la surface des particules virales semblent posséder une activité pro-apoptotique (c'est à dire qu'elle entrainerait la mort cellulaire). Néanmoins, peu de données existent sur leurs impacts réels *in vivo*. Les propriétés biologiques remarquables des protéines M justifient leur étude dans le cadre de cette recherche qui se concentrera sur leurs activités pro-apoptotiques et pro-inflammatoires *in vivo*. Des données préliminaires obtenues *in vitro* montrent le rôle de ces protéines M sur la mort cellulaire, mais la complexité physiologique d'un tissu nécessite de conforter ces observations *in vivo*.

L'objectif de cette étude est de déterminer si ces protéines M entraînent une apoptose et une neuroinflammation. Ces expériences pourraient permettre de mieux comprendre l'impact des protéines M sur le système nerveux central chez l'Homme et nous amener à développer de nouvelles thérapies préventives voire thérapeutiques chez l'homme en ciblant ces protéines.

Dans le cadre de cette étude, 6 constructions plasmidiques seront injectées dans le cerveau du poisson zèbre pour induire la surexpression de 5 protéines M (3 de ZIKV, 1 de Dengue, et 1 de fièvre jaune) et

la surexpression d'une protéine contrôle. Pour chaque construction, l'injection concernera un maximum de 21 poissons pour 3 temps de cinétique (24h, 48h et 72h) soit un nombre maximum total de 126.

Pour chacune de ces injections, nous analyserons aux différents temps l'inflammation résultant de ces surexpressions, l'apoptose et l'activité de neurogenèse régénératrice.

Tous les animaux utilisés seront des poissons zèbres dont l'âge sera compris entre 3 mois et 1 an. Les poissons seront des poissons mpeg:mcherry permettant de visualiser en rouge les cellules neuroinflammatoires immunitaires du cerveau.

Cette étude répond aux 3R

Remplacement : Il semble indispensable de passer au modèle animal pour mieux comprendre les effets *in vivo* des protéines M. Nous avons déjà des données obtenues *in vitro*.

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). Un premier lot de poisson sera injecté pour une analyse à 24h. Si ce temps de cinétique est suffisamment intéressant pour étudier l'ensemble des paramètres à analyser, ou si une toxicité insoupçonnée s'avèrait se mettre en place, il n'y aura pas d'injection avec analyse à 48 et 72h.

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. Toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale, et tout signe de souffrance sera étudié afin de prendre les mesures nécessaires.

Un enrichissement du milieu de vie est effectué en donnant de la nourriture de type artemia aux animaux.

A noter que le nombre théorique de 126 ne sera très certainement pas atteint si ces les données recueillies sont suffisamment solides.

17022 L'objectif de ce projet est scientifique et médical. L'autisme, ou trouble du spectre autistique, est une maladie développementale qui se caractérise par un développement anormal de l'enfant, principalement au niveau social, relationnel, et communicationnel. Les causes de cette maladie sont variées et restent encore mal comprises. Malheureusement, à ce jour, il n'existe pas de traitement médicamenteux satisfaisant pour soulager les malades et leurs familles. Le projet que nous développons a pour objectif 1) de mieux comprendre les mécanismes cérébraux impliqués dans la maladie et 2) de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Nous travaillons chez la souris, qui est un animal social et testons chez ces animaux différents traitements afin de vérifier s'ils pourraient être proposés comme nouveaux médicaments pour soigner l'autisme.

Le projet de recherche que nous développons tient compte du bien-être animal en respectant la règle des 3R à savoir raffiner, réduire et remplacer.

Nous raffinerons nos expériences en prenant un soin particulier pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux tout au long du protocole expérimental. Par exemple, afin d'augmenter le bien-être des animaux, ceux-ci seront hébergés dans un environnement enrichi (matériel de nidification) et libre accès à l'eau et aux aliments. De plus, nous avons défini des points limites (tels que la perte de poids et l'état général suite aux injections) pour l'ensemble de nos expériences pour anticiper et limiter le cas échéant les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux.

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser nos expériences, les animaux des deux sexes seront utilisés. De plus, chaque animal sera évalué dans plusieurs paradigmes comportementaux afin de recueillir le plus d'informations possible pour chaque cohorte expérimentale. Enfin, l'utilisation d'outils statistiques nous permet de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des expériences.

Nous ne pouvons toutefois pas nous passer du modèle animal car l'autisme est une pathologie complexe qui ne peut être modélisée qu'au niveau de l'animal entier, exprimant toute la variété de son répertoire comportemental.

La mise en œuvre du projet de recherche nécessitera l'utilisation de 1860 souris sur 4 ans.

17023 Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer dans le monde et la découverte de nouveaux traitements représente un challenge majeur.

Les modèles de souris génétiquement modifiées (ou transgéniques), conçus pour développer des cancers imitant avec précision leurs homologues humains, sont devenus l'un des modèles les plus pertinents et prometteurs non seulement pour étudier la biologie tumorale pulmonaire mais aussi pour permettre le développement de nouveaux traitements.

Des études précédentes ont montré l'importance d'une voie particulière, la voie Notch, dans certains cancers bronchiques. Nous voulons donc savoir si cela est également le cas dans d'autres types de cancers bronchiques. En raison de l'absence de modèle pour étudier la cancérogenèse entraînée par l'oncogène cMET (seul ou en présence d'autres altération génétique spécifique pour cette typologie des tumeurs bronchiques), nous avons l'intention de générer des nouveaux modèles de souris qui développent des tumeurs pulmonaires avec les mêmes caractéristiques génétiques retrouvées chez les patients.

Nous étudierons l'effet des inhibiteurs de la voie de signalisation Notch, seuls ou en combinaison avec des thérapies actuellement utilisées en clinique, afin de déterminer si le ciblage de cette voie peut être efficace dans le traitement des cancers bronchiques.

Pour ce projet nous souhaitons utiliser 860 souris comme expliqué ci-après.

Ce chiffre, regroupe les deux parties du projet :

- établissement /caractérisation des nouveaux modèles de souris transgénique;
- essais précliniques des ciblage thérapeutiques.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux. Nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux minimal pour garder une puissance statistique suffisante.
- « Raffiner » Afin d'améliorer la vie des souris, elles sont maintenues dans des cages tecniplast d'une superficie de 500cm². La litière est un mélange de litière et de copeaux de peuplier. L'enrichissement des cages se fait avec des briques de peuplier ou des carrés de cellulose. La méthodologie utilisée, implique la notion de points limites : nous porterons une attention particulière au bien-être des animaux (par exemple dans les conditions d'hébergement); surtout la prise en charge de la contrainte que les animaux subissent au cours des procédures expérimentales pour exemple une fois que le développement tumoral sera induit. Pour cela, nous effectuerons un suivi quotidien des animaux une fois que le développement tumoral sera induit. Les animaux seront aussi suivis par imagerie tous le mois pour identifier l'apparition de tumeur bronchique et prévenir l'apparition de signes de souffrance causés par la progression tumorale. Dans tous le cas ou les souris atteindraient le point limite, seront sacrifiés.
- « Remplacer ». Nous avons remplacé dès que possible le modèle *in vivo* par des modèles *in vitro*. En effet nous avons fait plusieurs tests *in vitro* qui nous ont permis d'identifier les traitements les plus adéquats pour cette expérimentation.

17024 La néphropathie à dépôts d'Immunoglobulines A (N-IgA) est une maladie rénale chronique caractérisée par le dépôt rénal d'Immunoglobulines A, protéines produites par le système immunitaire. Elle est une cause majeure d'insuffisance rénale dans le monde. Ces immunoglobulines entraînent une activation du système immunitaire et en particulier de protéines appelées complément, à l'origine une aggravation de l'inflammation rénale. Un tiers des patients atteints de N-IgA progressent au stade terminal de l'insuffisance rénale, nécessitant dialyse ou transplantation rénale. Il n'existe, à l'heure actuelle aucun traitement spécifique de la maladie. Des résultats issus de la littérature suggéreraient qu'un traitement empêchant l'activation du complément dans la N-IgA permettrait la diminution des lésions rénales habituellement observées. Nous souhaitons étudier l'effet sur cette maladie d'un inhibiteur du complément. Ce médicament, mélangé avec la nourriture des souris sous forme de croquettes sera

administré à des souris génétiquement modifiées qui développent spontanément la N-IgA avec activation du complément ou des souris sauvages.

Ce projet nécessitera 72 animaux au total, dont 36 souris contrôles et 36 souris génétiquement modifiées qui développent la N-IgA. Le phénotype des souris utilisées dans ce projet est non dommageable. Les souris seront alimentées avec les croquettes contenant les médicaments ou les croquettes contrôle (ne contenant pas le médicament), pendant une durée de 8 ou 16 semaines. Le protocole durera au total 2 à 4 mois selon le groupe expérimental. Un prélèvement de sang sera effectué au début et à la fin de l'expérimentation (8 semaines ou 16 semaines, en fonction du groupe expérimental), de même qu'un prélèvement urinaire tous les 15 jours, afin d'évaluer la fonction rénale. Les souris seront surveillées par l'équipe zootechnique quotidiennement, en plus d'une surveillance hebdomadaire spécifique par l'expérimentateur afin de s'assurer de la bonne tolérance digestive des croquettes (score spécifique, perte de poids). Les mesures nécessaires à la prise en charge de la douleur seront adaptées en fonction de l'état des animaux. En cas de douleurs, l'administration d'antalgique sera réalisée. L'évaluation des points limites sera également effectuée selon une grille de score adaptée. L'atteinte d'un point limite comme défini par la grille de score conduira à l'euthanasie immédiate de l'animal. Les souris seront euthanasiées en fin de procédure pour permettre l'analyse de leurs reins. Ce projet se déroulera sur une période de 1 an. La conformité avec les exigences de réduction, raffinement et remplacement sont prise en compte.

La règle des 3R, remplacement, raffinement et réduction sera respectée. Les connaissances issues de cette étude *in vivo* ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de l'interaction entre les immunoglobulines A, le système du complément, et la fonction rénale, qui nécessite de travailler à l'échelle d'un organisme. 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 à des données déjà existantes dans la littérature. Concernant le raffinement, les souris seront hébergées durant tout le protocole dans la en groupes sociaux, avec accès libre à l'eau et à la nourriture, et dans la possibilité de maintenir un comportement spécifique d'espèce. Les cages d'hébergement seront enrichies par l'enrichissement habituel effectué au sein de l'animalerie (bâtonnets d'ouate).

Enfin, les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. L'utilisation d'antalgiques sera systématique si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. En cas de persistance de la douleur, nous procéderons à l'euthanasie de l'animal.

17025 La maladie inflammatoire chronique des intestins (MICI) est une pathologie invalidante caractérisées par une inflammation de la paroi du tube digestif entraînant une dégradation significative de la qualité de vie des patients. Les MICI les plus courantes sont la colite ulcéreuse (ou rectocolite hémorragique) et la maladie de Crohn.

A l'heure actuelle, les mécanismes d'apparition de cette pathologie sont peu connus et aucun traitement curatif n'est disponible sur le marché. L'objectif de ce projet est de développer un modèle d'étude fiable des MICI pour permettre d'en accroître la compréhension et d'évaluer les propriétés immunitaires, thérapeutiques et toxicologiques de molécules issues de laboratoires académiques, biotechnologiques et pharmaceutiques.

Dans ce projet, des souris recevront un traitement au Dextran Sulfate Sodium (DSS), administré dans l'eau de boisson, et permettant d'induire une colite aiguë ou une colite chronique représentative des MICI. Les composés seront ensuite administrés par gavage, injection intrapéritonéale, intraveineuse ou intramusculaire, dans l'alimentation ou dans l'eau de boisson, en fonction du composé étudié.

Les souris seront hébergées en cage ventilée, par groupe social stable. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies *ad libitum*. La cage contiendra une couche de litière permettant aux souris de creuser, de se cacher et de réaliser un nid, élément essentiel à leur bien-être. Un morceau de bois, permettant aux souris d'exprimer leur comportement de rongeur, ainsi qu'un nid en carton seront également disposés.

Les souris bénéficieront d'une période d'acclimatation de 7 jours, minimum, avant l'entrée en projet, et seront habituées à la présence de l'expérimentateur qui les manipulera régulièrement. Les pièces d'hébergement disposeront d'un cycle lumière-obscurité (12h - 12h), d'une température (20 - 24°C) et d'une hygrométrie (45 - 65%) contrôlés en permanence.

Les souris seront monitorées tous les jours pour vérifier l'absence de souffrance. Celle-ci sera objectivée par une échelle de score adaptée aux maladies inflammatoires du tube digestif, notamment la présence de diarrhée et la perte de poids. Les animaux seront pesés deux à trois fois par semaine mais la fréquence pourra être augmentée en fin d'étude, si nécessaire.

Un total de 1500 souris adultes seront utilisées, couvrant une période 5 ans, permettant de réaliser 50 études précliniques. Le nombre de souris par étude sera de 5 à 10 individus par groupe, avec un minimum de 4 groupes (1 groupe placebo et 3 groupes traités). Le nombre exact de souris par étude sera réduit en fonction de tests statistiques adaptés aux effets attendus du traitement.

Les tests *in vitro* seront envisagés si ceux-ci sont appropriés. Néanmoins, il n'est actuellement pas possible de recréer, *in vitro*, une pathologie complexe comme les MICI et d'étudier son interaction avec le système immunitaire, tout en objectivant les effets thérapeutiques d'un composé. La souris constitue donc un modèle scientifiquement valide, robuste et indispensable pour le développement et la mise au point de traitements innovants pour ces maladies.

17026 Les cancers du sein triple négatif (CSTN) sont un sous-groupe de tumeurs agressives représentant 15% des cancers du sein. Du fait de l'absence de thérapies ciblées, la chimiothérapie reste à ce jour la seule option thérapeutique pour ces cancers.

Environ 35% des CSTN présentent un défaut de la fonction du gène BRCA1. Un défaut de fonction de BRCA1 est associé à une réparation des dommages à l'ADN moins efficace et une augmentation de la sensibilité à certaines chimiothérapies ainsi qu'aux inhibiteurs ciblant la protéine PARP1. Toutefois, cette sensibilité n'est souvent que transitoire et ces tumeurs peuvent rapidement devenir résistantes au traitement. En fait, dans ces tumeurs la fonction de BRCA1 n'est que partiellement altérée et la réparation de l'ADN est restaurée par des mécanismes de compensation.

Des résultats récents indiquent que les protéines BRD4 et CDK12 sont des régulateurs de la voie BRCA1. En effet, leur inactivation est associée à une baisse de l'efficacité de la réparation de l'ADN. Il serait donc possible d'atténuer la voie BRCA1 et ainsi sensibiliser les tumeurs résistantes au traitement en ciblant protéines BRD4 ou CDK12.

Des inhibiteurs pharmacologiques de BRD4 (JQ1) et CDK12 (Dinaciclib) sont disponibles et nous évaluons actuellement leur efficacité *in vitro* sur des lignées cellulaires. Nous vérifions si ces inhibiteurs augmentent la sensibilité des cellules tumorales à un traitement avec un inhibiteur de PARP1 ou des molécules telles que le carboplatine ou la Gemcitabine.

L'essai *in vivo* présenté ici vise à valider les observations faites *in vitro* sur cellules en culture. Dans l'essai que nous proposons ici nous appuierons sur les résultats d'un essai en cours et utiliserons les mêmes modèles de cancer du sein. Les modèles seront traités avec du carboplatine (CBP), de l'Olaparib ou de la Gemcitabine (Gem) en combinaison avec, soit un inhibiteur de BRD4 (JQ1), soit un inhibiteur de CDK12 (Dinaciclib) et l'effet sera comparé au traitement avec le JQ1 et le Dinaciclib seuls ou avec l'excipient. Les souris seront traitées pendant 4 semaines et la réponse évaluée en mesurant la taille des tumeurs greffées sur les animaux au cours du traitement. La reprise de la croissance de la tumeur après arrêt du traitement sera suivie pendant 4 semaines au maximum.

Le plan expérimental a été conçu en prenant en compte la règle des 3R ^[SEP] Remplacement : ce projet sur un système vivant est nécessaire pour valider nos observations sur cultures cellulaires. En effet, Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu. ^[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 mais les nombres prévus sont indispensables pour obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animaux 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.

Cette étude nécessite l'utilisation de 912 souris Nude sur une durée de deux ans et demi. Ces souris sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes de tumeurs humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire. Elles constituent donc le meilleur modèle pour des études de croissance tumorale à partir de xénogreffes de tumeurs humaines.

17027 Le système immunitaire est connu pour jouer un rôle essentiel dans la compréhension et le traitement de pathologie d'importance comme certaines infections virales (SIDA ou hépatites), de nombreux cancers, ou les maladies inflammatoires (asthme). À titre d'exemple, l'immunothérapie, représente une avancée médicale majeure de ces dernières années. Elle a pour principe la stimulation du système immunitaire du patient atteint de cancer, afin de lui permettre de détruire les cellules tumorales qui menacent son organisme.

Pour mieux comprendre le système immunitaire et soutenir le développement de thérapies innovantes, les chercheurs ont besoin de modèles précliniques prédictifs. En étudiant des espèces autres que l'homme, le risque est grand que les conclusions scientifiques issues d'études sur le rat ou le macaque, par exemple, ne soient pas transposables à l'espèce humaine. De tels échecs impliquent non seulement une perte significative d'animaux, mais aussi la mise à l'écart, parfois erronée, de candidats médicaments porteurs d'espoir pour de nombreux patients.

En greffant des cellules souches humaines à des souris immunodéprimées, nous pouvons reconstituer un système immunitaire humain, fonctionnel, et conduire des essais précliniques plus prédictifs de l'effet qu'aura un médicament chez l'homme en réduisant la barrière d'espèce humain – souris.

Dans le cadre de ce projet, les employé(e)s auront la possibilité d'acquérir la maîtrise des procédures sur souris, nécessaires au bon déroulement des études: injection dans la veine caudale, injection dans le sinus rétro-orbital, injection sous-cutanée, injection intrapéritonéale, gavage, prise de sang dans le sinus rétro-orbital, prise de sang dans la veine caudale, prélèvement intracardiaque terminal (suivi d'une dislocation cervicale) et injection hydrodynamique dans la veine de la queue. Les procédures ne pourront être effectuées que dans un ordre précis suivant un schéma préétabli permettant de réaliser une suite de procédures sur un seul animal, ou au rythme d'une procédure par semaine. Une période de 7 jours de récupération sera accordée entre deux (suite de) procédures. L'injection hydrodynamique ne sera acceptée qu'une seule fois par souris.

Réduction : Un total de 1750 souris seront utilisées. Afin de réduire l'utilisation de souris, et de mettre en œuvre un programme de formation représentatifs de nos activités *in vivo*, des souris issues de nos processus d'humanisation, mais n'ayant pas un niveau de cellules immunitaires humaines suffisant (<20%) pour entrer en étude seront utilisées en priorité.

Raffinement : Les souris seront hébergées en cage ventilée, par groupe social stable de 5 à 6 individus. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. La cage contiendra une couche de litière permettant aux souris de creuser, de se cacher et de réaliser un nid, élément essentiel à leur bien-être. Un morceau de bois, permettant aux souris d'exprimer leur comportement de rongeur, ainsi qu'un nid en carton seront également disposés. À leur arrivée, les souris bénéficieront une période d'acclimatation et seront habituées à la présence de l'expérimentateur qui les manipulera régulièrement. Les pièces d'hébergement disposeront d'un cycle lumière-obscurité (12h - 12h), d'une température (20 - 24°C) et d'une hygrométrie (45 - 65%) contrôlées en permanence.

Une échelle de points limites prenant en compte l'aspect du pelage, les mouvements, l'activité, la couleur des muqueuses et le score corporel permettra d'objectiver la présence de souffrances et pour amener au traitement ou à l'euthanasie des souris pour raison éthique.

Remplacement : Des formations théoriques préalables seront mises en place afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'apprentissage.

17028 Pour comprendre une pathologie humaine et réaliser des essais précliniques prédictifs, les chercheurs ont besoin de modèles d'études représentatifs de l'homme. Le développement de modèles de souris humanisées répond à cette demande.

En greffant des cellules souches humaines à des souris immunodéprimées, nous pouvons reconstituer un système immunitaire humain. Ce faisant, nous apportons un modèle d'étude spécifique de cet organe jouant un rôle essentiel dans la compréhension et le traitement de pathologies d'importance, comme certaines infections virales (virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou hépatite), de nombreux cancers, ou les maladies inflammatoires (asthme). Ce modèle permet, par exemple, d'inoculer le VIH à des souris. Cette spécificité engendre des résultats de grande valeur scientifique, complémentaire de ceux traditionnellement obtenus à partir du cynomolgus. En effet, ces derniers ayant des populations lymphocytaires non-spécifiques de l'espèce humaine, ils ne peuvent être infectés qu'avec le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), un virus apparenté mais différent du VIH.

Ce projet a pour objectif le développement et l'amélioration de processus d'humanisation nouveaux ou existants sur souris, et la modélisation d'une pathologie sur ces modèles humanisés, en particulier celles impliquant le système immunitaire. Ces modèles d'étude seront ensuite mis à disposition des chercheurs pour leur permettre d'étudier les maladies de l'homme et d'envisager des études précliniques davantage prédictives des effets qu'auront des molécules thérapeutiques sur un organisme humain.

Les procédures expérimentales impliqueront l'injection et l'administration de composés par voie parentérale (intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intramusculaire et intranasale) ou orale (gavage ou incorporation à l'alimentation). Ces procédures permettront d'induire l'humanisation ou de développer des modèles de pathologie. Des prélèvements réguliers permettront de monitorer le bon développement de l'humanisation ou du modèle de pathologie désiré. Les schémas d'injections et de prélèvements seront préétablis par le vétérinaire d'établissement et le comité de bien-être. Les procédures nécessitant une intervention chirurgicale ne seront pas acceptées dans le cadre de ce projet.

Réduction : Un total de 1000 souris adultes seront utilisées, couvrant une période de 5 ans, permettant de réaliser 100 études de 10 individus. Le nombre exact d'animaux par étude sera réduit en fonction d'études statistiques adaptées à chaque étude.

Raffinement : Les souris seront hébergées en cages ventilées, par groupe social stable. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. La cage contiendra une couche de litière permettant aux souris de creuser, de se cacher et de réaliser un nid, élément essentiel à leur bien-être. Un morceau de bois, permettant aux souris d'exprimer leur comportement de rongeur, ainsi qu'un nid en carton seront également disposés. À leur entrée dans le projet, les souris bénéficieront d'une période d'acclimatation et seront habituées à la présence de l'expérimentateur qui les manipulera régulièrement. Les pièces d'hébergement disposeront d'un cycle lumière-obscurité (12h - 12h), d'une température (20 - 24°C) et d'une hygrométrie (45 - 65%) contrôlés en permanence.

Les souris seront monitorées tous les jours pour vérifier l'absence de souffrance. Celle-ci sera objectivée par une échelle de score adaptée. Les animaux seront pesés trois fois par semaine mais la fréquence pourra être augmentée en fin d'étude, si nécessaire. Le vétérinaire aura pleine autorité pour envisager un traitement anti-douleur ou une euthanasie de la souris pour raison éthique s'il le juge nécessaire.

Remplacement : Les tests *in vitro* seront envisagés si ceux-ci sont appropriés. Néanmoins, lorsqu'il n'est pas possible de recréer, *in vitro*, les interactions complexes qui peuvent exister entre un organe fonctionnel, une pathologie et les effets de composés médicamenteux les impliquant, les souris aux systèmes humanisés constituent une approche scientifiquement valide, robuste et indispensable au développement et à la mise à disposition de thérapies innovantes pour les patients.

17029 Contexte Scientifique

Ce programme de recherche est axé sur l'étude des mécanismes de troubles auditifs induits par des surexpositions sonores. Une surexposition à des bruits professionnels (bruit de machines) ou récréatifs (soirée en boîte de nuit, concert de rock) peut entraîner des déficits auditifs pouvant aller d'une perte

d'audition (surdité)   de l'hyperacousie (intolérance aux sons forts) et des acouphènes (14 à 17 millions de personnes acouph niques en France). L'étude des mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces déficits auditifs pourraient permettre de développer chez l'homme, des outils de protections et de réparations de ces atteintes. Une hypothèse serait que les cellules sensorielles de l'organe de l'audition (la cochlée) libèrent trop de neurotransmetteur pendant la surexposition sonore, ce qui aurait pour conséquence d'endommager les fibres du nerf auditif. Ces fibres nerveuses alors endommagées ne seraient alors plus en mesure de transmettre convenablement le message auditif vers le cerveau produisant ainsi les troubles auditifs cités précédemment (surdités, hyperacousie, acouphènes). Pour tester cette hypothèse, nous appliquerons dans la cochlée des drogues qui miment un excès de neurotransmetteur puis nous observerons l'état fonctionnelles des neurones du nerf auditif à l'aide de technique électrophysiologique pendant le mois qui suivra l'application de la drogue. Ces résultats seront ensuite comparés à ceux obtenus après une surexposition sonore.

28 lots de gerbilles seront utilisés pour cette étude (16 lots pour l'étude pharmacologique et 12 lots pour l'étude après exposition sonore). Un nombre de 20 gerbilles par lot sera nécessaire et suffisant selon une évaluation statistique basées sur des études antérieures menées dans le laboratoire. En conséquence le nombre maximum de gerbilles, tous lots confondus, sera de $28 \times 20 = 560$.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

- « Remplacer ». Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales

Dans ce projet, le modèle expérimental s'appliquera à la Gerbille (*Meriones unguiculatus*) qui possède une gamme auditive de basse fréquence représentant un modèle précieux pour la compréhension de l'audition humaine. Par ailleurs, une grande partie des études sur les mécanismes auditifs a été réalisée sur la gerbille de Mongolie, afin de permettre une comparaison des résultats obtenus avec ceux déjà publiés il est essentiel d'utiliser cette espèce. Elles possèdent également des caractéristiques anatomiques uniques qui permettent l'application de drogues directement sur le nerf auditif, à travers la fenêtre ronde de la cochlée.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant 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 l'efficacité du traitement.

Une étude statistique nous a conduits à utiliser 560 gerbilles pour 2 procédures expérimentales lors de cette étude qui se déroulera sur 5 ans.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites. Les animaux feront l'objet d'une surveillance rapprochée afin de détecter les points limites de souffrance. Le bien-être de l'animal sera assuré en respectant la surface des cages et en enrichissant le milieu. Les animaux seront hébergés par 6 dans un milieu enrichi par des copeaux de bois, des tunnels et des maisons en plexiglass. Lors des expérimentations les gerbilles, maintenues à 37 C, seront anesthésiées par un mélange de Zol til Rompun (0.1ml/100g) (IP) renouvelé au tiers toutes les 90 min. Cette anesthésie n'altère pas les fonctions auditives périphériques et centrales permettant l'activité normale des rétrocontrôles mis en œuvre par le système efférent auditif. Cette anesthésie sera complétée par l'injection de xylocaine (IM) lors des opérations chirurgicales.

Les animaux seront particulièrement surveillés après l'opération pour évaluer tout signe de souffrance : en cas de baisse du poids, de modification de l'apparence (yeux mi-clos, le poil hérissé, le dos courbé, animal prostré), ou de problème post-chirurgical (saignement, ouverture de la cicatrice, infection cutanée). La reprise d'activité motrice ainsi que la reprise de l'alimentation normale (nourriture et hydratation) sont contrôlées deux fois par jours après les interventions. Les gerbilles conservées sont isolées dans des grandes cages dans un milieu enrichi, avec des copeaux dans la litière, des tunnels et des maisons en plexiglass.

Les animaux potentiellement en souffrance ( valuation selon les signes de souffrance classiques incluant les mimiques faciales stéréotypées, le dos vouté, la prostration, le poil ébouriffé, l'anorexie) seront soulagés par une injection de buprénorphine ou mis à mort en cas de souffrance persistant au-delà de 24 heures.

17030 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la plus fréquente des maladies neurodégénératives du neurone moteur adulte (2 à 3 nouveaux cas pour 100 000 habitants / an). A ce jour, elle reste incurable et fatale. La SLA présente des formes sporadiques et familiales ; parmi ces dernières environ 20% des cas découlent de mutations du gène SOD1. Sur cette base génétique, diverses lignées de souris transgéniques ont été mises au point, qui reproduisent les principaux symptômes de la maladie et sont à la base d'un grand nombre de de recherches pré-cliniques dans ce domaine.

A l'échelle cellulaire, la SLA se caractérise par la perte de deux types de neurones: les neurones corticospinaux, localisés dans le cortex cérébral et qui connectent le cerveau à la moelle épinière, et les neurones moteurs bulbaires et spinaux, situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière et qui relaient les informations du cerveau vers les muscles striés squelettiques. De récentes études menées chez les patients SLA suggèrent que la maladie pourrait prendre son origine au sein du cortex cérébral et se propager vers le bulbe rachidien et la moelle épinière, le long des projections corticofuges (qui connectent le cortex cérébral à ses cibles).

L'objectif de ce projet de recherche est de déterminer s'il serait possible d'endiguer ou de freiner la progression de la SLA en bloquant l'activité des neurones corticofuges dans un modèle murin de la maladie, les souris Sod1G86R.

Dans ce projet, nous utiliserons au maximum 272 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 pour réaliser ce projet de recherche de recourir à des modèles murins qui présentent, en outre, une organisation du système nerveux proche de celle de l'homme.

- Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux dans ce projet, les animaux destinés aux études fonctionnelles seront également inclus dans les analyses histologiques. 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 de tests 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, 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 de carton blanc), 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 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. Enfin, nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge analgésique lorsque nécessaire.

17031 Contexte : Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité d'un produit destiné au chat.

Pour qu'un médicament soit autorisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un effet bénéfique pour l'animal et ce pour une ou plusieurs pathologies. Les études sont réalisées sur l'espèce cible, comme exigé par la réglementation (Pharmacopée européenne et réglementation des pays destinataires).

Pour démontrer l'efficacité d'un produit contre un agent pathogène, la mise au point d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire, de manière expérimentale, la pathologie le plus fidèlement possible à la réalité.

Objectifs : L'objectif du projet est donc de déterminer l'effet bénéfique du produit lors de l'épreuve.

Pour certaines pathologies, une étude d'amplification *in vivo* sur chats de la souche d'épreuve peut être nécessaire pour obtenir une souche utilisable dans une épreuve expérimentale.

Avantages et dommages : Le développement expérimental de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques provoquant une gêne ou une douleur à l'animal. L'administration du pathogène peut également générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés. De plus, des points limites spécifiques à chaque pathologie sont appliqués.

La finalité de ces études est de développer des produits efficaces pour réduire l'impact des maladies infectieuses sur les populations.

Informations sur les espèces utilisées : En se basant sur l'historique du produit testé, les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé au plus, à 2160 chats.

Mise en œuvre des 3Rs : Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un produit thérapeutique consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection, réduisant ainsi le nombre de candidats à tester *in vivo* donc le nombre d'animaux utilisés. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Réduction : Pour les études réglementaires, le nombre d'animaux est fixé par les textes. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chats utilisés en limitant le risque d'études non conclusives.

Raffinement : Des points limites spécifiques à chaque pathologie ont été définis afin de limiter le plus précocement possible la douleur des animaux. Ces critères sont en constante évolution pour les améliorer de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel des connaissances vétérinaires. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie et une analgésie peuvent être réalisées lors de certains actes si nécessaires.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge pour maximiser leur confort et leur bien-être. Dans la majorité des cas, les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place.

La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

17032 Notre service a pour principale mission de cryopréserver les lignées de souris génétiquement modifiées des animaleries dans le but de sécuriser et rationaliser leur utilisation. Il propose également la revitalisation/ redérivation des lignées de souris à partir de matériel congelé (sperme et embryons congelés). Toutes ces techniques demandent un transfert d'embryons (de 0.5 jour à 3.5 jours) par voie chirurgicale chez une mère-porteuse. La technique utilisant le TCET (transcervical embryo transfert) est une méthode de transfert non-chirurgical d'embryons au stade de 3.5 jours. Cette technique utilise une sonde permettant de déposer, par la voie vaginale, des embryons au stade de 3.5 jours. Cette méthode de transfert d'embryons serait avantageuse par rapport à la méthode chirurgicale et applique totalement la règle des 3R :

- REMPLACER. La mise au point d'une nouvelle technique de revitalisation ne peut pas se faire sans l'utilisation d'animaux. Nous avons besoin de savoir si la technique marche et pour cela nous avons besoin de voir s'il y a des naissances.

- REDUIRE le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour atteindre la compétence du transfert d'embryons jusqu'à 80%,

- RAFFINER en diminuant le temps nécessaire pour atteindre la compétence du transfert d'embryon jusqu'à 80% et ainsi éviter la chirurgie. En changeant la technique de transfert d'embryons chez une souris, les contraintes sont limitées : pas besoin d'intervention chirurgicale, pas de plaie, taux élevés et stable de gestation et de naissance. Tous les animaux bénéficient d'un environnement enrichi conformément à la réglementation.

Pour la réalisation de ce projet de transfert de blastocystes par voie naturelle à l'aide de la sonde TCET, un maximum de 60 souris sera utilisé. D'un point de vue pratique, le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet. Toute procédure stressante ou douloureuse sera réalisée sous anesthésie générale.

17033 Dans le système nerveux central, la protéine Tau contribue au maintien de l'intégrité cellulaire. Tau se retrouve à l'intérieur des cellules sous deux formes dans le cerveau adulte humain : les formes comprenant 3 domaines répétés dans sa séquence (Tau 3R) et celles qui en comprennent 4 (Tau 4R). Les lésions associées à l'agrégation de la protéine Tau sont les plus fréquentes au sein des maladies neurodégénératives regroupées sous le terme tauopathies. Elles sont notamment retrouvées dans la maladie d'Alzheimer, la paralysie supra-nucléaire progressive, la maladie de Pick, certaines démences fronto-temporales et la dégénérescence corticobasale. Les tauopathies diffèrent selon les formes de Tau qui composent les lésions, leur morphologie, les cellules et régions cérébrales affectées ainsi que par le tableau clinique. Dans la maladie d'Alzheimer, la tauopathie débute dans les neurones du cortex temporo-médian comprenant l'hippocampe, puis s'étend à l'ensemble du cortex cérébral selon un schéma spatiotemporel stéréotypé dont on a montré qu'il corrélait avec le déclin cognitif des sujets affectés. Ce type de propagation est commun à ce groupe de maladies neurodégénératives mais affecte des réseaux neuronaux distincts et propres à chaque tauopathie. Ceci suggère que la progression des lésions de Tau se produit de l'intérieur d'une cellule à une autre, le long des voies neuroanatomiques, où se produit la conversion de la forme normale de Tau au contact de la protéine Tau de conformation anormale. Ce phénomène rappelle le mode de réplication du prion, un agent infectieux composé uniquement de protéine. La grande hétérogénéité des tauopathies sous-entend l'existence de diverses formes de protéines Tau pathologiques évoquant l'existence de souches comme observé dans les maladies à prion (maladie de la vache folle, maladie de Creutzfeldt-Jakob). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'induction et la propagation intercellulaire de la tauopathie selon les différents types de lésions de tau ne sont pas élucidés et le projet présenté ici a pour but d'avancer sur ces connaissances. En parallèle, nous étudierons comment l'infection cérébrale par le SARS-CoV-2 pourrait interférer avec la propagation de la tauopathie. Au cours des six derniers mois, le coronavirus SARS-CoV-2 a infecté près de 12 millions de personnes et en a tué plus de 540 000 dans le monde. L'infection par le SARS-CoV-2 provoque la maladie COVID-19 qui peut entraîner un syndrome de détresse respiratoire aiguë sévère. Le SARS-CoV-2 infecte les cellules pulmonaires alvéolaires de type II qui expriment des niveaux élevés de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2), utilisée par le virus pour l'entrée dans les cellules hôtes. Des symptômes neurologiques, notamment une confusion et une altération de l'état mental, ont été observés chez des patients atteints de COVID-19 en particulier chez les personnes âgées. L'infection cérébrale est un nouvel aspect de la pathogenèse du coronavirus SARS-CoV-2 et nous étudierons comment l'infection cérébrale par le SRAS-CoV-2 pourrait interférer avec la propagation de maladies neurodégénératives telles que la tauopathie. Pour mener à bien notre projet, nous réduirons au minimum les études *in vivo* indispensables à l'analyse de l'induction et de la propagation pour chaque tauopathie au niveau de l'organisme. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 300 animaux (200 souris transgéniques et 100 rats). Les souris transgéniques sont des outils indispensables pour les études que nous souhaitons aborder. Néanmoins, les rats non-transgéniques expriment naturellement les formes de Tau 3R et 4R alors que les souris que nous utilisons possèdent uniquement des formes 4R. Les rats seront déterminants pour étudier les tauopathies induisant des lésions de Tau 3R.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée 1) remplacer : les études de propagation de la pathologie de Tau permettant de répondre aux questions posées ne peuvent être réalisées que sur des souris transgéniques P301ST43, P301ST43xK18hACE2 et K18hACE2 ainsi que sur des rats ; 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 animaux sont hébergés en groupe avec un nid dans chaque cage et dispose donc d'un environnement enrichi. Les animaux sont soumis à une chirurgie sous anesthésie générale. La chirurgie est effectuée en analgésie et ne s'accompagne pas d'effets secondaires dommageables. Les paramètres vitaux des

animaux sont contrôlés tout au long de la procédure. Le réveil des animaux est surveillé et une dose d'antalgique est administrée aux animaux afin de réduire la souffrance post-opératoire.

17034 Les activités humaines sont une source de stress pour la faune sauvage. Cependant, il est impossible de mettre en évidence les effets dissociés de différentes sources de stress dans le milieu naturel. Pour établir des relations causales, des études en laboratoire sont nécessaires. C'est pourquoi dans ce projet nous adoptons une approche écotoxicologique en laboratoire. Nous nous concentrerons sur les effets de la pollution en éléments traces métalliques (Plomb, Cadmium, Cuivre, Fer, etc...) qui peut avoir des effets importants sur la santé humaine et animale. Dans ce projet nous étudierons les effets d'une pollution constituée de différents polluants (cocktail de polluants) à faible concentrations (pollution diffuse). Ces effets cocktails sont rarement étudiés et pourtant représentent une réalité que l'on retrouve dans les milieux urbains. Nous travaillerons sur des oiseaux en captivité : le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*). Ces oiseaux seront exposés à des cocktails de polluants représentatifs d'une pollution urbaine.

Dans cette étude notre objectif est d'étudier les effets d'un cocktail réaliste d'éléments traces métalliques sur la physiologie et le comportement des oiseaux adultes. En particulier, nous évaluerons les effets de cette exposition sur le stress oxydatif, l'efficacité immunitaire et un indicateur de survie. De plus, nous étudierons si les oiseaux sont capables suivant l'intensité de l'exposition à ces éléments traces de modifier leur alimentation (varie en quantité et qualité de graines consommées) afin de pallier aux effets délétères éventuels de cette pollution.

Ce projet sera réalisé en accord avec la règle des 3R. Nous avons choisi d'avoir 10 à 12 oiseaux par groupe afin d'avoir une puissance de test statistique satisfaisante tout en réduisant le nombre d'animaux impliqués dans l'expérience (=Réduction). Au total nous utiliserons 208 oiseaux pour ce projet. Certains oiseaux seront réutilisés entre les expériences pour limiter le nombre différents d'oiseaux utilisés, et à la fin du projet les oiseaux seront soit gardés en vie à l'animalerie à des fins d'élevage soit réhabilités (par exemple : placement chez des particuliers). Pour l'enrichissement des cages nous utilisons des perchoirs et branchages (=Raffinement). Enfin, les expériences sur la bioaccumulation et les effets de la pollution sur la physiologie de l'oiseau ne peuvent par définition être réalisées que chez l'animal vivant (=Remplacement). Ce projet n'entraîne pas de douleur pour les oiseaux. Cependant les captures entraînent forcément du stress. Il a alors été décidé de réduire au minima le nombre de captures.

17035 - Mots-clés: pharmacocinétique, produit pharmaceutique vétérinaire, animaux de rente, bioéquivalence
- Raison du projet : Etudes règlementaires ou études pilotes dans le cadre du développement de produits pharmaceutiques vétérinaires

Les études règlementaires répondent aux prescriptions de la réglementation européenne (European Medicines Agency, EMEA/CVMP/133/99-FINAL du 8 septembre 2000 pour les études de pharmacocinétiques ou EMA/CVMP/016/2000-Rev.3 du 6 Décembre 2018 pour les études de bioéquivalence).

- Objectif du projet: Le projet vise à évaluer en laboratoire la pharmacocinétique de produits vétérinaires destinés aux animaux de rente. L'objectif est d'estimer les paramètres d'absorption, de distribution, de biotransformation et d'élimination du produit administré à l'animal. Dans le cas d'études de bioéquivalence, l'objectif est d'évaluer l'équivalence pharmacocinétique (ou bioéquivalence) entre un produit d'essai (un produit générique par exemple) et le produit de référence sur le marché.

Globalement, l'évaluation de la pharmacocinétique passe par l'administration du produit à tester à l'espèce cible concernée (bovins, ovins, caprins, porcins, équins, lapins ou volailles) à la dose maximale recommandée (une ou plusieurs administrations), par la voie recommandée. Des prélèvements sanguins sont ensuite effectués à intervalles réguliers dans les heures, jours ou semaines suivant l'administration du produit afin de suivre la concentration plasmatique de la substance active et/ou de ses dérivés.

Dans le cas d'étude pharmacocinétique chez des animaux en lactation (bovins, ovins, caprins) après injection intra-mammaire du produit, la substance active est mesurée dans le lait à des intervalles définis suivant l'administration du produit.

- Bénéfice attendu du projet : les études de pharmacocinétiques sont nécessaires au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché de tout produit vétérinaire. L'étude des concentrations plasmatiques permet de déterminer les conditions d'utilisation du produit (doses, fréquence et durée du traitement) chez chaque espèce cible.

- Animaux : bovins, ovins, caprins, porcins, équins, lapins ou volailles.

Le nombre d'animaux est défini de façon à permettre une analyse statistique valide. Le nombre d'animaux par groupe est généralement compris entre 8 et 16.

Le nombre de groupes varie en fonction du type d'étude. Généralement, dans le cadre du dossier d'AMM, les études de pharmacocinétique comparent 2 groupes (études de bioéquivalence ou de biodisponibilité). Dans le cadre du développement de produits, le nombre de groupes peut être augmenté afin de comparer différentes conditions d'administration (doses, voies, fréquences, formulations, etc.).

Le nombre d'études de pharmacocinétique envisagé est de:

- . 2 par an pour les bovins, soit 320 bovins sur une période de 5 ans.
- . 2 par an pour les porcins, soit 320 porcins sur une période de 5 ans.
- . 1 par an pour les ovins, soit 160 ovins sur une période de 5 ans.
- . 1 par an pour les équins, soit 160 équins sur une période de 5 ans.
- . 1 par an pour les lapins, soit 160 lapins sur une période de 5 ans.
- . 1 par an pour les volailles, soit 160 volailles sur une période de 5 ans.

- Dommages attendus : La seule souffrance attendue correspond à l'administration du produit d'essai et aux prélèvements de sang veineux effectués à intervalles réguliers sur les animaux. La souffrance attendue est classée légère pour les gros animaux (volume sanguin prélevé généralement inférieur à 5% du volume circulatoire) et modérée pour les petits animaux (volume sanguin prélevé pouvant aller jusqu'à 10% du volume circulatoire).

Dans le cas de prélèvement de lait, la souffrance attendue est légère et correspond à celle de la traite habituelle.

L'hébergement et le soin aux animaux sont conformes à l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles.

Conformément à la loi, les animaux ayant reçu un produit en développement seront euthanasiés (dans les conditions fixées dans l'arrêté du 1er février 2013).

- 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 est celui requis pour obtenir une analyse statistique valide.

Dans les études de bioéquivalence, une approche dite en "cross-over" peut être choisie afin de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Dans ce cas, l'étude est réalisée en 2 phases séparées par une période de "wash-out" permettant l'élimination complète du produit de l'organisme. Les animaux d'un même groupe reçoivent le produit d'essai dans une première phase, puis le produit de référence dans une deuxième phase (ou inversement selon le plan d'étude).

Chez le lapin et les volailles, lorsque des volumes sanguins importants sont nécessaires, les animaux sont alors euthanasiés puis saignés. Dans ce cas, le nombre d'individus par temps de prélèvement est diminué (entre 3 et 6) afin de réduire le nombre total d'animaux dans l'étude.

. Raffinement : l'espèce choisie est l'espèce cible du produit testé. La contention des animaux vise à limiter au maximum leur stress. La souffrance légère ou modérée induite par l'étude est nécessaire pour évaluer la pharmacocinétique du produit testé. Les conditions d'hébergement des animaux sont adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers pour leur permettre d'exprimer le plus possible

leur gamme normale de comportements. Le bien-être des animaux est évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux : animaliers et vétérinaires.

17036 La radiothérapie représente avec la chirurgie et la chimiothérapie, l'une des stratégies thérapeutiques les plus utilisées contre le cancer. Plus de la moitié des patients atteints de cancers sont traités par radiothérapie. Cependant, l'efficacité de la radiothérapie est limitée par une sensibilité aux radiations ionisantes très variable d'un organe à l'autre et par les effets secondaires sur les tissus sains environnants la tumeur. C'est pourquoi, de nombreux patients atteints de cancer ne reçoivent pas une dose suffisante pour détruire efficacement la tumeur. Il est donc impératif de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'augmenter l'efficacité des traitements.

Lors de récents travaux, il a été montré que les radiations ionisantes induisaient du cannibalisme cellulaire. Le cannibalisme cellulaire (ou entose) a été identifié comme un processus de destruction des cellules cancéreuses par d'autres cellules cancéreuses. Il existe une corrélation inverse entre l'induction de l'entose et la présence de métastases dans des cancers humains suggérant ainsi que le cannibalisme peut être défini comme un mécanisme intrinsèque anti-tumoral. C'est pourquoi nous voulons développer de nouvelles approches thérapeutiques dont l'objectif est d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie en favorisant le déclenchement du cannibalisme cellulaire.

Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier l'immunité anti tumorale dans sa globalité avec toutes les interactions nécessaires (système immunitaire, voies hormonales, médiateurs physiologiques). Cet environnement est impossible à reproduire dans toute sa complexité et sa régulation *in vitro* ou *ex vivo* (un de nos objectifs étant de comprendre les mécanismes immunitaires mis en place contre les cellules entotiques).

Etant donné que la détection du cannibalisme cellulaire et de la sénescence dans des cancers du sein semble prédire *in vitro* la réponse clinique des patients aux traitements neo-adjuvants il est maintenant indispensable de tester l'effet anti-tumoral de ces modulateurs *in vivo* (molécules de la banque Prestwick) sur des modèles murins.

Suite à différents criblages, nous avons identifié des agents pharmacologiques capables d'augmenter le déclenchement du cannibalisme cellulaire à la suite de l'exposition aux radiations ionisantes et nous souhaitons apprécier l'effet anti-tumoral (régression de la taille de la tumeur et activation ou non du système immunitaire) de ces modulateurs *in vivo* en mettant en œuvre des modèles murins de transplantation. Nous suivrons la croissance tumorale en fonction des différents traitements.

Le recours à des modèles animaux est donc indispensable pour étudier les effets de ces nouvelles combinaisons thérapeutiques dans un contexte qui inclut le micro environnement tumoral et donc le système immunitaire. Il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *ex-vivo* du fait de sa complexité.

Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapeutique humaine de ces nouveaux produits, 3920 souris seront nécessaires et plusieurs expérimentateurs interviendront sur 5 années d'étude. Une analyse statistique a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives de croissance tumorale.

Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au minimum l'inconfort et la souffrance des animaux.

Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de souffrance ou de toxicité des traitements. Un enrichissement (cocoons) sera mis à disposition des animaux en permanence.

17037 En 2019, la population porcine était de 24 millions d'animaux, répartis dans toute la France. Cette filière de production animale représente un poids économique important, et il est basé, une partie, sur un système d'élevage industriel où les animaux sont confinés dans des exploitations fermées. Cependant, des germes pathogènes, comme le virus de la Peste Porcine Africaine peuvent infecter des élevages suite à des erreurs de prévention sanitaire, comme l'importation mal contrôlée d'animaux provenant de pays infectés. Actuellement, la France est indemne de cette maladie, mais en cas d'apparition de cas

de Peste Porcine Africaine, les animaux ne seraient pas transportés en dehors de leur exploitation, ils ne seraient pas soignés, mais mis à mort sur place, par mesure de précaution, et les cadavres seraient rapidement détruits avant la désinfection de leur lieu de vie. La réalisation de la mise à mort en dehors d'un abattoir spécialisé doit s'enseigner, à la fois du point de vue pratique et du point de vue théorique. Notre établissement souhaite accueillir cette formation, à destination des agents de l'état qui pourraient être chargés de la réalisation de ces mises à mort pour raisons sanitaires.

Une formation, pour une quinzaine d'agents, doit former à plusieurs méthodes de mise à mort et pour cela, après l'utilisation de simulateurs, fera appel à des animaux vivants pour une véritable mise en situation. Le nombre d'animaux, pour former une vingtaine de stagiaires, sera de 10 porcs, dans des catégories d'âges variées. C'est le nombre minimum qui permet d'effectuer des démonstrations et de permettre aux agents de réaliser le geste, afin, par la suite, de le reproduire, en provoquant une souffrance et stress aussi réduit que possible. Avant la réalisation de la formation, les animaux seront hébergés en groupes sociaux, dans des boxes sur litière avec une nourriture et des soins adaptés. Le remplacement des animaux vivants pour ce type de formations est possible, au moyen de mannequins ou de cadavres pour permettre aux personnes de se mettre en situation ou de travailler les gestes, cependant, une ou deux réalisations sont nécessaires pour que le formateur s'assure que la personne réalise le geste en limitant la souffrance des animaux.

17038 La réparation ou régénération musculaire faisant suite à une blessure implique, entre autres, un type particulier de cellules, les cellules souches du muscle strié squelettique. Lors d'une lésion, les cellules souches s'activent, se multiplient et fusionnent pour former de nouvelles fibres musculaires et restaurer la fonction du tissu musculaire. Une question clé est l'environnement tissulaire au sein duquel les cellules souches musculaires sont activées. A ce jour, les processus physiologiques impliqués dans la régénération du muscle squelettique ont été largement décrits dans des modèles de réponse à une lésion toxique mais restent encore mal connus en réponse à l'exercice, qui est le principal vecteur de blessures musculaires. De manière générale, l'étendue des lésions musculaires induites par un exercice peut varier en fonction de son intensité (i.e., de légère à élevée). Les analyses conduites chez l'Homme sont incomplètes du fait de la limitation à l'accès au matériel biologique (biopsies) et de la grande variabilité entre les individus analysés suite à une blessure musculaire. Les lésions musculaires induites par l'exercice ont un coût élevé pour les sociétés et sont dommageables dans certaines conditions, comme le vieillissement. Les différents traitements mis en œuvre pour tenter d'accélérer et améliorer la régénération musculaire sont très controversés, n'ayant pas été validés au niveau expérimental et clinique. Aussi les processus de régénération musculaire pourraient être différents en fonction du sexe. Toutefois, les données de la littérature restent controversées notamment en raison de protocoles expérimentaux non-standardisés de dommages musculaires conduisant à des atteintes fonctionnelles et des réponses inflammatoires extrêmement hétérogènes, l'utilisation de marqueurs indirects de l'intégrité tissulaire, l'absence de suivi du cycle ovarien et une caractérisation incomplète du processus de réparation musculaire (i.e., limitée aux premières heures post-exercice).

Ce projet de recherche fondamentale vise i) à mettre en évidence l'influence du sexe sur les différentes étapes de la réparation musculaire en nous appuyant sur un modèle préclinique standardisé de lésions musculaires physiologiques induites par un exercice d'intensité variable (i.e., de légère à élevée) d'électrostimulation neuromusculaire ii) à identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le programme quinquennal de l'équipe. Il s'appuie sur deux procédures expérimentales et mobilise au maximum un total de 2620 souris. Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux : nous utilisons un dispositif expérimental totalement non-invasif qui permet de réaliser un suivi longitudinal de la force musculaire sur les mêmes animaux rendant les préparations chirurgicales obsolètes (et réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés). Des banques biologiques informatisées issues des expérimentations limitent l'utilisation de nouveaux animaux car elles permettent les études histologiques et les cultures cellulaires pour plusieurs analyses. Des prélèvements multiples sont réalisés après euthanasie sur le même individu pour des tests parallèles.

Le cycle ovarien est contrôlé afin de standardiser les conditions expérimentales pour les souris femelles et réduire le nombre d'animaux nécessaire.

- Remplacement : Nous explorons les interactions cellulaires au sein du tissu musculaire et nous cherchons à comprendre comment ces interactions contrôlent le bon fonctionnement du tissu. Pour ce projet en physiologie animale, les modèles animaux sont indispensables car la lésion est induite par un exercice, ce qui est impossible à reproduire *in vitro*. Aussi, les études de physiologie nécessitent l'utilisation de modèles animaux car seule l'analyse du tissu, voire de l'organisme entier permet d'identifier le réel impact de ces interactions moléculaires et cellulaires sur la fonction de l'organe. Les analyses moléculaires des interactions identifiées seront réalisées *in vitro* à l'aide de cultures cellulaires. Enfin, nous visualiserons *in vivo* la dynamique des cellules impliquées dans la régénération musculaire grâce à des approches de microscopie intravivante.

- Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Les procédures expérimentales utilisées incluent un recours systématique à l'anesthésie générale profonde lors de l'électrostimulation et des analyses par microscopie intravivante. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Aussi, un suivi quotidien des animaux permet d'éviter toute souffrance inutile et de prendre les mesures adéquates dans le cas d'un éventuel phénotype dommageable.

17039 L'asthme allergique est une inflammation chronique des voies respiratoires caractérisée par une difficulté respiratoire et une production excessive de mucus liée à l'inhalation d'allergènes. Une personne sur 4 souffre d'asthme dont 80% sont d'origine allergique. Les allergènes de l'environnement sont plus fréquemment en cause que les allergènes alimentaires. En France, l'asthme toutes causes confondues, touche environ 6% de la population et est à l'origine de 1000 décès par an.

Le but de ce projet est d'étudier et de comprendre les mécanismes d'activation impliqués en nous concentrant sur le rôle des cytokines, récepteurs et des voies de signalisation majeures impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte lors du développement de l'asthme allergique chez la souris induit par les acariens (HDM : House Dust Mite), OVA (ovalbumine), papaïne (protéase à cystéine fragilisant la barrière épithéliale) et les pollens (BP : Birch Pollen). Dans ces modèles d'inflammation pulmonaire, les animaux vont développer une maladie respiratoire qui mime les symptômes similaires à ceux observés chez les patients asthmatiques. Dans les modèles expérimentaux chez l'animal, l'asthme allergique se caractérise par un recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons, principalement des cellules de la famille des globules blancs (éosinophiles, lymphocytes, neutrophiles) et une production importante de mucus. Plusieurs modèles murins d'asthme allergique permettent d'étudier la pathologie et de comprendre les mécanismes sous-jacents à l'aide de souris déficientes pour les gènes correspondants. Les animaux immunodéficients utilisés ne présentent pas de phénotypes dommageables.

Ce projet s'inscrit dans la continuité d'un projet qui a déjà fait l'objet d'une évaluation pour le modèle d'asthme induit par HDM, OVA, papaïne et BP.

Les précédentes études réalisées nous ont permis de mettre au point les différents modèles et par la suite de mettre en évidence une partie du mécanisme d'induction de l'asthme allergique. L'administration d'un allergène, va permettre l'activation de la réponse inflammatoire via diverses voies de signalisation (inflammasome, famille d'interleukine, récepteur d'interféron...), de plus certaines molécules impliquées ont la capacité d'amplifier l'inflammation. Il est nécessaire de continuer les expérimentations afin d'approfondir ces nombreux mécanismes d'activation de la réponse inflammatoire, le cheminement immunologique n'étant pas encore totalement élucidé.

Le but de ce projet est d'étudier les différentes voies de signalisation de l'asthme allergique dans différents modèles d'asthme mis au point au laboratoire. Pour étudier l'asthme allergique, les souris vont recevoir à des temps précis des allergènes environnementaux et vont développer une insuffisance respiratoire spécifique de la pathologie caractérisée par une hyperréactivité bronchique (réaction disproportionnée des bronches après l'exposition à un irritant ou un effort). L'insuffisance respiratoire est liée à un afflux de cellules dans les tissus pulmonaires et une production excessive de mucus. L'analyse de l'hyperréactivité bronchique (résistance et compliance) sera réalisée sur des animaux

profondément anesthésiés suivie d'une mise à mort pour étudier différents paramètres inflammatoires, immunologiques et histologique dans les poumons

La durée des expérimentations dépend de l'allergène administré (typiquement 17 jours s'il s'agit de l'allergène HDM, 25 jours pour les allergènes OVA ou BP, et 1 à 22 pour l'allergène papaïne). Au cours de l'expérimentation, en fonction des modèles, les animaux peuvent présenter une légère perte de poids et vont développer une gêne respiratoire. L'asthme allergique provoqué par HDM, OVA, BP et papaïne n'engendre pas douleur chez l'animal.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c sauvage ou génétiquement modifiée. L'administration des allergènes à l'animal se fait par voie intranasale, intratrachéale ou intrapéritonéale sous anesthésie afin de minimiser les situations douloureuses et stressantes.

Une surveillance quotidienne des animaux 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 (selon les normes d'hébergement détaillées dans 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. En se basant sur toutes les voies d'activation de la réponse inflammatoire possible, sans oublier les molécules impliquées et/ou pouvant exacerber la réaction aux 4 allergènes, nous estimons le nombre d'études à 32 études comprenant 84 animaux, soit 2688 animaux maximum sur 5 ans.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'activation et de régulation de l'inflammation. 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 adaptés sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal. De plus, de l'anesthésique sera utilisé pour mesurer l'hyperactivité bronchique.

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.

17040 Cette étude a pour objectif de déterminer la localisation et la distribution de peptides (séquences de plusieurs acides-aminés) chez la souris par imagerie de fluorescence. Des études précliniques antérieures, réalisées chez la souris, ont démontré l'intérêt thérapeutique de ces peptides pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique.

Cette étude nécessitera au total 12 souris, qui seront au préalable inoculées par une leucémie lymphoïde chronique. Après cette injection, les peptides marqués par un fluorochrome (substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation) seront ensuite injectés aux souris et un suivi sur 24h par imagerie de fluorescence sera réalisé. A l'issue de l'imagerie, les souris seront mises à mort par exposition au dioxyde de carbone.

L'ensemble de ce projet respecte la règle des 3R (principes de remplacement, de réduction et de raffinement). Concernant le principe de remplacement, cette étude portant sur la localisation et la distribution des peptides, nous ne pouvons donc pas répondre au principe de remplacement. Cependant, seuls les peptides ayant démontré une activité thérapeutique sont étudiés dans ce projet. Le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction). Le bien-être des animaux est primordial durant ce projet, les souris sont hébergées selon les normes de soins et d'hébergement mentionnées à l'article R. 214-95 du code rural et de la pêche maritime. Elles sont logées en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles. Les souris disposent d'un espace suffisant avec des cages répondant à la réglementation et enrichies

d'igloos. Les souris, après avoir observé une phase d'acclimatation, sont incluses dans la procédure expérimentale, elles bénéficient d'un suivi quotidien approprié (principe de raffinement).

17041 Le Trouble de Déficit d'Attention avec ou sans Hyperactivité (TDAH) est une maladie caractérisée par des problèmes d'attention, d'impulsivité et d'hyperactivité qui surviennent chez l'enfant et peuvent persister chez l'adulte. De nombreuses études montrent que les patients TDAH adultes ont un risque accru de développer une addiction, notamment à la nourriture.

L'objectif de ce projet est de comprendre à l'aide d'un modèle animal de TDAH les modifications cérébrales qui pourraient être à l'origine de cette association.

Le modèle animal de TDAH utilisé est un modèle de rat parfaitement décrit dans la littérature scientifique qui correspond à des rats de souches SHR/NCrl comparés à des rats de souche témoin WKY/NHsd. Un total de 100 animaux, soit 40 rats SHR/NCrl et 60 rats WKY/NHsd sera utilisé. Ces animaux seront soumis à un protocole d'addiction à la nourriture riche en sucre qui sera objectivé sur le plan comportemental. Pendant ce protocole, les modifications d'activité cérébrale seront étudiées par imagerie.

Il répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacement : le TDAH comme les troubles de perte de contrôle de prise alimentaire ne sont pour l'instant pas encore modélisables par des méthodes *in vitro* ou cellulaires.

Réduction : l'utilisation de méthode d'imagerie au cours de ce protocole va permettre de réduire le nombre d'animaux utilisé qui est néanmoins dicté par les différents groupes expérimentaux requis pour l'obtention de résultats permettant de répondre à la question scientifique posée.

Raffinement : tout sera mis en œuvre pour maximiser le bien-être des animaux pendant le protocole. Les animaux seront en cycle inversé pendant l'ensemble du protocole, avec un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau dans leur cage d'hébergement et seront pesés chaque jour, 15 min avant chaque expérimentation. Les animaux seront hébergés par groupes sociaux, 2 par cage en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel, papier absorbant et bâton à ronger. Toutes les stratégies d'analgésie et d'anesthésie et de soin seront mises en œuvre pour réduire au maximum tout inconfort qui pourrait être induit par ce modèle.

17042 La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une cause majeure de morbidité et de mortalité partout dans le monde. La BPCO est une limitation persistante du flux d'air dans les voies aériennes, généralement progressive et associée à une réponse inflammatoire chronique des voies respiratoires et des alvéoles pulmonaires. L'exposition chronique à la fumée de cigarette est le facteur de risque principal contribuant à la pathogénèse de cette maladie. Les nouveaux systèmes de délivrance de nicotine (ENDS) sont commercialisés comme étant des « produits non ou moins nocifs » et leurs défenseurs invoquent le bénéfice de ces systèmes pour permettre la réduction du tabagisme et, en conséquence, la diminution des pathologies liées au tabac. Cependant, les premières études scientifiques sur les ENDS évoquent des produits dangereux du fait de la présence de nicotine et d'arômes pouvant être pro-inflammatoires et pro-oxydants. D'autres études montrent peu de toxicité après exposition aiguë, mais l'effet de l'exposition chronique reste peu connu. Des résultats préalables identifiant les effets de la cigarette classique et des principaux composants de l'e-vapeur des ENDS sur un modèle cellulaire en 3D mimant la barrière alvéolo-capillaire ont été réalisés. La perte de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire accompagnée de processus inflammatoires et pro-oxydants est caractéristique de la BPCO. Ainsi, une étape cruciale dans notre projet est le modèle murin qui est prometteur pour décrire la physiopathologie de cette maladie.

Le but global de ce projet est de valider l'effet de la cigarette sur le système respiratoire et ses conséquences sur les fonctions cardiaques et de comparer ainsi l'effet des ENDS récemment commercialisés et voire si leur effet est plus ou moins néfaste que les cigarettes classiques.

Dans cette étude, nous validons dans un premier temps le modèle animal par exposition à la cigarette classique. Une fois validé le système sera utilisé pour voir l'effet respiratoire et cardiopulmonaire chez la souris exposée de manière chronique aux nouveaux dispositifs délivrant la nicotine (ENDS).

Remplacement: une modélisation de la barrière alvéolo-capillaire *in vitro* sur des modèles cellulaires a été réalisée pour sélectionner les différentes possibilités d'exposition et les dispositifs délivrant la nicotine. Le modèle souris reste crucial et permet d'étudier de manière complète le système pulmonaire et cardiaque, tel qu'il peut être affecté chez l'Homme. La possibilité de modification génétique reste prometteuse pour décrire la physiopathologie de la BCPO

Réduction: Dans ce projet, nous comptons utiliser 216 souris. Nous avons au préalable mis en place et validé un modèle cellulaire d'exposition aux différents dispositifs délivrant la nicotine. Afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser dans partie de notre projet, nous avons identifié les principaux mécanismes physiopathologiques induits par les différentes possibilités d'exposition et ces mécanismes seront la cible de nos travaux *in vivo*

Raffinement: les animaux seront hébergés dans des conditions de stabulation optimales et avec un milieu enrichi. L'état de santé général des souris est suivi tous les jours. Il consiste dans le suivi du poids, de la pression artérielle, de la vie en groupe (en respectant la hiérarchie et l'intégration des nouveaux animaux), de la présence de blessures par morsure ou d'autres lésions externes. Pour certain test comme l'échographie, les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane et un suivi post-anesthésique des animaux est réalisé en les mettant dans une cage chauffée et aérée.

17043 L'autisme est une maladie du développement diagnostiquée en présence de deux types de symptômes : (1) une perturbation du comportement social et (2) des comportements répétitifs.

On ne connaît actuellement pas la cause de la maladie et il n'existe pas de traitement médicamenteux satisfaisant pour soulager les malades et leurs familles. Le projet que nous développons a pour objectif 1) de mieux comprendre l'origine de la maladie et 2) de proposer de nouveaux traitements.

Nous travaillons chez la souris, qui est un animal social : nous utilisons notamment des souris qui présentent des mutations génétiques ressemblant à celles des patients autistes. Nous testons chez ces animaux différents traitements afin de vérifier s'ils pourraient être proposés comme nouveaux médicaments pour soigner l'autisme.

Le projet de recherche que nous développons tient compte du bien-être animal en respectant le principe des 3R à savoir raffiner, réduire et remplacer.

Nous raffinerons nos expériences en prenant un soin particulier pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux tout au long du protocole expérimental. Par exemple, nous hébergeons nos animaux dans un environnement enrichi (maisonnette en carton, matériel de nidification) afin d'augmenter le bien-être des animaux. De plus nous avons défini des points limites pour l'ensemble de nos expériences pour limiter les situations de souffrance ou d'inconfort des animaux.

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser nos expériences, nous nous attachons d'une part à utiliser les animaux des deux sexes (mâle et femelle) et d'autre part à tester chaque animal dans plusieurs paradigmes comportementaux afin de recueillir le plus d'informations possible pour chaque cohorte expérimentale. Enfin, l'utilisation d'outils statistiques puissants nous permet de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des expériences.

Nous ne pouvons toutefois pas nous passer du modèle animal car l'autisme est une pathologie complexe qui ne peut être modélisée qu'au niveau de l'animal entier, exprimant toute la variété de son répertoire comportemental.

Le projet dans sa globalité a nécessité l'utilisation de 3380 animaux sur 5 ans. Cette avenant, déposé suite au transfert de mes activités de recherche dans un nouveau laboratoire concerne l'utilisation de 1680.

17044 L'Hypophosphatémie liée à l'X (XLH) est la forme la plus fréquente de rachitisme génétique (1/20000 naissances). Cette pathologie touche massivement le squelette et les dents, entraîne un rachitisme, des déformations osseuses associées à une accumulation d'inhibiteurs de minéralisation tels que l'ostéopontine (OPN), des douleurs osseuses, un retard de croissance constant, des anomalies dentaires sévères chez l'enfant (nécroses et abcès spontanés) et chez l'adulte (abcès spontanés, susceptibilité accrue à la parodontite), et des manifestations ostéoarticulaires impactant la qualité de vie des patients. Le plus souvent, cette maladie est diagnostiquée dans la petite enfance sur des

troubles de la marche et de la croissance. Le XLH résulte de mutations inactivatrices du gène PHEX (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome) qui aboutissent à une perturbation de la phosphatémie. Le traitement actuel repose chez l'enfant sur l'association de calcitriol et de phosphate commencés le plus tôt possible. C'est la précocité du diagnostic, l'observance, la multidisciplinarité des soins et l'optimisation des doses qui maximiseront les résultats sur la croissance. Il semble cependant plus en plus évident que poursuivre le traitement à l'âge adulte est bénéfique.

Notre projet vise donc à étudier l'histoire naturelle du XLH et ses mécanismes physiopathologiques afin d'adapter les traitements conventionnels et de développer des nouveaux traitements. Pour cela le modèle utilisé sera un modèle murin de la pathologie humaine, la souris hypophosphatémique Hyp.

Nous évaluerons par micro-scanner chez les souris Hyp 1) les manifestations squelettiques au cours du temps 2) l'impact d'un traitement précoce ou tardif au calcitriol et phosphate sur le développement de ces manifestations squelettiques.

Trois procédures seront réalisées :

- La première procédure consiste à traiter les souris avec du calcitriol et du phosphate
- La deuxième procédure est un suivi longitudinal des souris par analyse microCT
- La troisième procédure est un prélèvement pour analyses de données biologiques

Durant le temps des expériences, les souris seront surveillées quotidiennement et des mesures prises afin de réduire la douleur. 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, et le suivi longitudinal permet de raffiner la méthodologie. Au total 140 souris seront utilisées.

L'utilisation d'animaux nous permettra d'avoir une vue d'ensemble et une meilleure compréhension i) du processus physiopathologique conduisant aux manifestations squelettiques et ii) de ses traitements, qui ne peuvent être appréhendés dans des modèles *in vitro*. Notre projet permettra une meilleure compréhension de la physiopathologie des hypophosphatémies. Ceci pourrait permettre à terme le développement de nouvelles thérapeutiques.

17045 Ce projet a pour objectif de caractériser la capacité d'anticorps (ou de fragments de ces anticorps) à lever le blocage neuromusculaire induit par un curare utilisé en anesthésie, le rocuronium. La persistance de l'action du rocuronium après une intervention chirurgicale prolonge les séjours des patients dans les services de réanimation. Il est nécessaire de pouvoir stopper rapidement l'effet de la curarisation d'un patient par exemple via l'administration de composés capables de capturer le curare et de lever le blocage neuromusculaire que celui-ci induit. Nous cherchons à caractériser les propriétés de décurarisation des anticorps anti-rocuronium que nous avons identifié *in vitro*. En particulier, nous cherchons à identifier un anticorps ou un fragment de cet anticorps capable de lever efficacement le blocage neuromusculaire sans induire d'effets secondaires néfastes.

Même si les curares utilisés en anesthésie sont des molécules relativement sûres induisant peu de réactions adverses sévères (1/10,000 patients souffrent de réactions sévères, principalement un choc anaphylactique), il est impossible de prédire précisément leur durée d'action. Seul le monitoring instrumental quantitatif de la curarisation permet d'exclure avec certitude une curarisation résiduelle, qui correspond à la présence persistante de molécules de curares inhibant les jonctions neuromusculaires. Cette curarisation résiduelle est une complication majeure (jusqu'à 83% des patients) de l'utilisation des curares car elle peut être responsable d'hypoxémie, d'hypercapnie, de troubles de la déglutition et donc d'inhalation pulmonaire du liquide gastrique, entraînant un allongement de la durée de séjour à l'hôpital et une augmentation la morbi-mortalité. La curarisation résiduelle peut être évitée en injectant une cyclodextrine synthétique, le sugammadex (Bridion®). L'avantage majeur du sugammadex est qu'il peut permettre une décurarisation, même lors d'une curarisation très profonde, dès les premières minutes qui suivent l'injection du curare. Toutefois, le sugammadex ne s'adresse qu'aux curarisations induites par le rocuronium et des réactions adverses d'hypersensibilité au Sugammadex ont été rapportées. Il serait donc intéressant d'identifier de nouvelles molécules de capture du rocuronium.

Dans nos travaux, plusieurs anticorps monoclonaux anti-rocuronium identifiés à partir de souris immunisées contre le rocuronium ont des affinités très élevées pour le rocuronium. Ces très fortes affinités suggèrent que des anticorps anti-curare pourraient être utilisés dans le cadre de la décurarisation soit en urgence (échec d'intubation), soit en routine clinique afin de lever rapidement le blocage neuromusculaire.

Ce projet inclut 2 procédures et utilise au total 356 souris:

(1) Une procédure de classe sévère permettra de déterminer la dose sublétales et d'identifier les différents signes cliniques précédant la mort. Elle utilisera 20 souris jeunes adultes sur une période de 1 mois. Ces données n'existent pas dans la littérature.

(2) Une procédure de classe modérée permettra de tester l'efficacité de décurarisation des anticorps anti-rocuronium par injection intraveineuse d'anticorps 30 secondes après l'injection de rocuronium. Elle utilisera 336 souris de jeunes adultes sur une période de 5 ans.

Les curares injectés n'induisent pas a priori de douleur, puisqu'ils ne provoquent pas de spasmes musculaires. En revanche une dose proche ou supérieure à la dose nécessaire pour l'obtention d'un bloc neuromusculaire à 90 % (ED90) induira une paralysie de l'activité pulmonaire.

Plusieurs points limites ont été définis, correspondant soit à l'apparition de manifestations respiratoires sévères (signes de respiration abdominale marquée, de suffocation ou dyspnée aggravée) ou d'hypothermie sévère. L'expérimentateur sera présent en continu pour surveiller l'apparition de ces points limites, et mettre à mort les animaux le cas échéant afin de réduire au maximum la douleur et la souffrance de chaque animal.

Le suivi de la curarisation sera effectué visuellement (mobilité, vitalité, difficultés respiratoires) et un suivi de la température rectale sera effectué en procédure 1 afin d'établir si ce paramètre peut être utilisé comme point limite pour la procédure 2. En fonction des résultats de cette procédure 1 de mise au point de la dose de rocuronium, la procédure 2 pourrait bénéficier de couvertures chauffantes si une hypothermie est observée. La curarisation étant induite par bolus, sa durée ne devrait pas excéder 30 minutes, ce qui ne nécessite pas de prévoir une réhydratation. Pour que notre approche corresponde à un modèle préclinique pertinent et avec le minimum d'inconfort/souffrance pour les souris de laboratoire, nous nous sommes imposés deux contraintes : i) établissement de la dose optimale de curare induisant une réaction sublétales en quelques minutes ; ii) mise en œuvre d'analyses *in vivo* avec des fenêtres temporelles les plus courts possibles.

Les pathologies et thérapies qui vont être étudiées ici résultent de réactions systémiques et impliquent des conséquences au niveau de différents tissus et organes. Ces processus sont complexes, reposant sur les singularités du système circulatoire et des tissus cibles, processus qui ne peuvent pas être reproduits *in vitro*. Nos procédures expérimentales 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 biologiquement pertinent.

Le recours à des lignées de souris consanguines de souris permet, entre autres, de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental, et de ne pas prolonger les explorations dès lors que sont initiées et mesurées les conséquences biologiques de l'infusion de curares. La taille des lots a été réduite à un strict minimum tout en permettant une analyse statistique pertinente.

17046 L'anorexie mentale (AM) est un trouble des conduites alimentaires qui se caractérise par une restriction alimentaire et une hyperactivité compulsives aboutissant à une dénutrition chronique et des complications organiques et psychiatriques sévères. Parmi les troubles psychiatriques, l'AM a le taux de mortalité le plus élevé et un taux de rechute important, et il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique efficace. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'AM est donc essentielle et un enjeu de santé publique. L'objectif de ce projet est donc de déterminer les mécanismes neurobiologiques impliqués dans les anomalies de la récompense dans l'AM et notamment l'interaction entre les facteurs métaboliques et des régulateurs centraux du système de la récompense, comme la dopamine (DA). Etant donné qu'il s'agit d'une pathologie dont l'origine est multifactorielle et associe notamment des facteurs de risque génétiques et environnementaux, nous développerons des modèles murins qui combinent une vulnérabilité génétique aux comportements addictifs basés sur les études

chez l'humain et l'exposition à des facteurs de risque environnementaux (restriction alimentaire et activité physique). Nous réaliserons des inactivations géniques dans des régions ciblées du cerveau, en croisant de nouvelles lignées de souris ou en réalisant l'injection de vecteurs génétiques dans des régions ciblées du cerveau. Grâce à des explorations comportementales, nous évaluerons les anomalies du système de la récompense alimentaire dans les différents modèles murins. Nous évaluerons également les anomalies métaboliques (dépense énergétique, test de tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline) de ces souris. Enfin, les études immunohistochimiques biochimiques (mesure de biomarqueurs de l'état nutritionnel à partir de prélèvements sanguin) et moléculaires (mesure des biomarqueurs neuronaux) nous permettront de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques mis en jeu dans cette pathologie et d'identifier les cibles spécifiques au niveau du système nerveux central de l'action des senseurs métaboliques.

Ces différentes procédures seront menées en conformité avec la règle des « 3R » (Réduire, raffiner, remplacer). Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons basée sur des données collectées au cours d'expériences précédentes et une analyse de puissance statistique. Lorsque cela sera possible, les mêmes animaux seront utilisés dans différentes procédures expérimentales légères. D'autre part, les explorations fonctionnelles seront menées dans les conditions les moins invasives et les moins stressantes : hébergement dans des cages avec enrichissement, utilisation de systèmes de mesure automatisée de l'activité et du comportement alimentaire afin de limiter l'intervention de l'expérimentateur, miniaturisation des dosages sanguins pour limiter le volume de sang prélevé. Afin de limiter toute souffrance ou angoisse des animaux, les injections de vecteurs pour la création de lignées seront effectuées sous anesthésie générale profonde et des analgésiques seront utilisés pour éviter la douleur. 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 (raffinement). Ce projet ayant pour objectif d'étudier des altérations cérébrales et comportementales complexes mimant la pathologie humaine, une approche intégrée chez l'animal est indispensable. Le nombre total de souris nécessaires à la réalisation de ce projet est de 1840 pour une durée de 5 ans. Ce projet permettra ainsi de caractériser un modèle pré-clinique des principaux symptômes de l'AM, de comprendre les mécanismes impliqués dans la neurobiologie de la récompense, plus particulièrement le rôle des senseurs métaboliques induits par l'état de dénutrition dans les anomalies du comportement alimentaire et l'hyperactivité compulsive, et ainsi identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter cette pathologie pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement pharmacologique.

17047 L'allongement de l'espérance de vie dans les pays développés est associé à l'émergence de pathologies dégénératives qui contribuent à alourdir les contraintes des systèmes de santé publique. Le vieillissement se caractérise par le développement d'une sarcopénie qui est définie comme la perte involontaire de masse et de fonction musculaire. La sarcopénie est en partie responsable de la perte de mobilité, la fragilité et la morbidité des personnes âgées. De plus l'atrophie musculaire est souvent associée à des situations pathologiques dont l'incidence augmente avec l'âge et se traduisent par des coûts élevés d'hospitalisation. Ainsi, prévenir la fonte musculaire contribuerait au maintien de l'autonomie et de la bonne santé des personnes ainsi qu'à une diminution des coûts de santé publique. Le repas et notamment les acides aminés stimulent la synthèse protéique musculaire tandis que la sécrétion d'insuline, stimulée par le repas, inhibe la protéolyse et augmente le flux sanguin musculaire fournissant les substrats au muscle. Cet effet du repas est altéré en conditions pathologiques et au cours du vieillissement. Ainsi, l'identification des mécanismes de régulation de la synthèse et de la dégradation des protéines musculaires est cruciale pour le développement de stratégies nutritionnelles ou de potentielles interventions pharmacologiques qui pourraient inhiber l'atrophie musculaire ou favoriser l'hypertrophie.

Ce projet consiste en la mise au point d'une technique fiable de mesure de la synthèse protéique musculaire qui pourra ensuite être utilisée dans des projets testant différentes stratégies nutritionnelles permettant de lutter contre la perte musculaire au cours du vieillissement ou de pathologies.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. En effet, ce projet permettra la mise en place de méthodes alternatives à la mesure de la synthèse protéique in-vivo et proposera une méthode ex-vivo.

Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats de qualité. Enfin, les animaux bénéficieront de conditions d'hébergement optimales et recevront chaque soin nécessaire. Ce projet nécessitera au maximum 120 rats.

In fine, ce projet permettra de fournir une méthode fiable de mesure de la synthèse protéique musculaire *ex-vivo* qui s'affranchira de la méthode mettant en oeuvre des radio-isotopes, méthode couteuse et présentant des risques pour le manipulateur (risque d'exposition aux rayonnements ionisants).

17048 L'utilisation de liposomes est une stratégie pertinente pour améliorer le traitement des maladies pulmonaires. Les liposomes sont des vésicules sphériques composées de bicouches lipidiques capable d'encapsuler les médicaments hydrophiles ou lipophiles et de les transporter. Ces systèmes d'administration présentent des avantages pour l'administration locale, tels qu'un dépôt uniforme et une distribution élevée sur la surface pulmonaire. L'administration de médicaments directement par les voies aériennes, une voie non invasive, permet de réduire le dosage des médicaments. En effet, les molécules actives ainsi administrées peuvent avoir un début d'action rapide et atteindre des concentrations locales élevées.

Au sein des poumons, les macrophages jouent des rôles très variés et représentent des cibles prometteuses dans le cadre de nombreuses maladies pulmonaires dans lesquels l'inflammation joue un rôle prépondérant telle que la fibrose pulmonaire. Un défi actuel consiste à appliquer les connaissances issues des études fondamentales sur les caractéristiques des macrophages présents au sein des poumons pour le développement de thérapies ciblées sur le traitement des maladies pulmonaires. Ainsi, ce projet vise à caractériser et évaluer le comportement de liposomes vides fonctionnalisés avec différents ligands afin de tester leurs affinités pour les différents macrophages pulmonaires dans un modèle d'inflammation pulmonaire. Dans un second temps, ces liposomes chargés en principe actif seront testés afin d'améliorer la libération spécifique de molécules anti-inflammatoires pour la réduction de l'inflammation pulmonaire.

Ces études seront menées sur des souris. Le recours à l'animal est incontournable car le poumon est un tissu élaboré composé de nombreux types cellulaires (fibroblastes, macrophages, cellules à mucus, les cellules ciliées...). Le micro-environnement pulmonaire est caractérisé par la présence d'une matrice extracellulaire complexe dont la composition varie elle aussi suivant le niveau d'inflammation. Ainsi, il n'existe pour le moment aucun modèle cellulaire permettant de modéliser cette complexité.

Dans un souci de réduction, l'étude sera menée, dans un premier temps, *ex vivo* sur des macrophages primaires prélevés dans le poumon de la souris. Ces macrophages sont plus représentatifs de l'état physiologique *in vivo* que les lignées immortalisées de macrophages, ces dernières ayant été cependant utilisées pour la mise au point des procédures.

Les meilleures formulations seront ensuite testées *in vivo* sur un modèle d'inflammation pulmonaire.

Une planification statistique minutieuse permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Pour la réalisation de ce projet, nous utiliserons 415 souris sur 5 ans.

Les animaux seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi afin de favoriser leur bien-être. Les méthodes utilisées seront appropriées pour réduire le plus possible le stress que pourraient ressentir les animaux. Des méthodes d'anesthésie seront utilisées le cas échéant pour exécuter toute intervention douloureuse.

17049 Les maladies cardiovasculaires continuent d'être une des causes de mortalité principales, ni seulement en France mais dans le monde entier. Les concentrations sanguines élevées en lipides (cholestérol et triglycérides) représentent un facteur de risque majeur pour le développement des maladies cardiovasculaires, avec une incidence notamment élevée chez les patients diabétiques. Une protéine qui a été impliqué dans la régulation des taux de cholestérol circulants ainsi que dans le développement des maladies cardiovasculaires est la lipase hépatique. Cette protéine exprimée principalement par le foie a comme fonction d'internaliser les lipides sanguins. Ainsi, une absence totale de la lipase hépatique ou une réduction de l'expression de la lipase hépatique chez l'homme augmente

significativement les taux de cholestérol et de triglycérides sanguins. Néanmoins, de nombreux aspects de la fonction multivers de cette protéine restent inconnus.

Nous avons identifié un nouveau variant génétique dans le gène de la lipase hépatique dans une famille lyonnaise. Ce variant semble être responsable pour les taux de cholestérol très bas observés dans cette famille potentiellement à cause d'une augmentation de la fonction de la protéine par un mécanisme encore méconnu. Dans ce projet nous visons donc à caractériser de façon détaillée l'impact de ce nouveau variant sur le métabolisme des lipoprotéines chez la souris. Nous estimons qu'une meilleure compréhension de ce variant pourrait nous renseigner des informations clé sur la fonction de la lipase hépatique. Cette information pourrait être amené à nous fournir des pistes pour abaisser des taux de cholestérol et triglycérides sanguins de façon thérapeutique chez les patients présentant des taux élevés de cholestérol et triglycérides.

Pour pouvoir comparer au mieux nos données cliniques avec nos données expérimentales, nous utiliserons des souris avec un profil lipidique 'humanisé' ; les souris APOE3-CETP-Tg. Pour obtenir les profils lipidiques 'humanisés' chez ces souris, nous devons d'abord les mettre sur un régime enrichi en acides gras et cholestérol. Ensuite, pour analyser la fonction de la lipase hépatique sauvage et de son variant, nous surexprimerons la lipase hépatique sauvage ou mutant chez ces souris avec des vecteurs viraux. Suite à la surexpression, nous analyserons l'impact des différents vecteurs viraux sur le métabolisme lipidique de ces souris. Finalement, pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels ce variant génétique induit une baisse des taux de cholestérol, nous utiliserons les souris LDLR-KO, qui manquent un récepteur clé du métabolisme lipidique, le LDLR. En effet, la lipase hépatique collabore dans certaines circonstances avec le LDLR pour l'internalisation des lipides. Suite à un régime enrichi en acides gras et cholestérol, nous surexprimerons également la lipase hépatique sauvage ou mutant chez ces souris avec des vecteurs viraux et nous analyserons leur impact sur le métabolisme lipidique de ces souris.

Pour ce projet, nous aurions besoin d'un maximum de 288 souris. Ceci inclut 4 groupes de souris par lignée pour pouvoir mener à bien au total 5 expériences pour caractériser le métabolisme lipidique. Ce projet a été construit avec la volonté de mettre en place et de respecter « les trois R ». Effectivement, nous essayons d'exécuter une grande partie du travail de base, nécessaire pour répondre aux objectifs comme défini sous 3.3.1, *in vitro*. Pour valider nos données obtenues *in vitro* et pour analyser le métabolisme des lipoprotéines dans un contexte physiologique, nous sommes ensuite obligés d'utiliser les modèles animaux. Par contre, seules les expériences indispensables au succès du projet seront mises en œuvre. Le nombre de souris nécessaires pour chaque expérimentation a été défini statistiquement en utilisant nos anciennes données obtenues par les mêmes types d'expériences. De plus, pour réduire le nombre des souris utilisées, nous réutiliserons les mêmes souris pour plusieurs expériences, évidemment avec des intervalles temporels appropriés. Egalement, les procédures ont été réfléchies pour réduire au maximum le stress et les souffrances des souris soumises aux expérimentations. Les souris seront hébergées en groupe, sauf pour des périodes très courtes pour certains protocoles ou les souris seront temporairement hébergées en cage individuelle. Comme les protocoles décrits sont de classe légère et ne sont pas très invasifs, nous utiliserons uniquement l'application locale de la lidocaine sur la queue pour réduire la souffrance des souris liée aux prélèvements sanguins caudaux. Pendant certains protocoles spécifiques, les souris seront anesthésiées à l'aide de l'isoflurane. Comme le métabolisme des lipides est une situation physiologique complexe à laquelle plusieurs organes participent, il n'existe malheureusement pas à l'heure de méthodes *ex vivo/in vitro* pour remplacer les expérimentations animales.

17050 Prévenir le déclin cognitif dans une population où l'on vit de plus en plus âgé est un enjeu majeur de santé publique. Des recherches antérieures ont montré que les tâches d'orientation et navigation spatiale sont idéales pour stimuler les régions cérébrales nécessaires à la cognition d'ordre supérieur. Ces dernières sont particulièrement affectées durant le vieillissement.

Dans ce projet, nos objectifs sont de comprendre les mécanismes participant au déclin cognitif lié à l'âge, ainsi que tenter diverses approches afin de ralentir celui-ci chez des modèles rongeurs âgés.

Pour cela, nous développerons des paradigmes permettant la stimulation des réseaux neuronaux impliqués dans ces mécanismes. Dans un premier temps, nous identifierons anatomiquement les

neurones impliqués par le biais d'une double injection de traceurs dans le cerveau. Ensuite, l'étude du comportement et de leurs signatures neuronales se feront à travers de défis cognitifs. Les animaux seront implantés d'une canule dans le cerveau, permettant la stimulation pharmacologique locale de la région d'intérêt. Des tests complémentaires pour établir l'état de stress et d'anxiété des animaux seront réalisés au cours de ce projet.

Des études seront effectuées sur des souris normales adultes et âgées. Au total 1882 animaux seront nécessaires à cette étude.

Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105 :

Remplacer : Ce projet nécessite des études de comportement et de mémorisation. L'utilisation de l'animal est indispensable, il n'y a pas d'alternative par des modèles *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour atteindre l'objectif scientifique de ce projet avec des résultats statistiquement interprétables.

Raffiner : 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 chirurgicales, la douleur sera prévenue par l'administration d'opioïdes en pré- et post- opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance adaptée des animaux en fonction des procédures pour s'assurer de leur bien-être.

17051 Notre laboratoire développe des colles chirurgicales biocompatibles et biodégradables pouvant avoir différentes applications cliniques. Un premier produit a été évalué en clinique en tant que sealant pour être utilisé comme adjuvant aux sutures en chirurgie vasculaire. Nos colles peuvent servir pour d'autres indications cliniques, par exemple pour remplir des cavités. Nous nous intéressons notamment au traitement de fistules. Une fistule est un conduit faisant communiquer anormalement un organe interne avec la peau, ou deux organes entre eux. Il s'agit donc d'étroits conduits, creux en leur centre et couverts de tissus granulaire et cicatriciel. Les traitements actuels offrent seulement de faibles taux de guérison. Notre projet consiste à évaluer le potentiel de nos colles à soigner des fistules, en les occluant et en y permettant la régénération du tissu. Après une caractérisation de nos produits (propriétés physicochimiques, adhésion aux tissus, porosité...) et l'implantation de disques de produits en sous-cutané chez des rats (évaluation de la biocompatibilité, de l'invasion cellulaire), ce projet nous permettra de valider *in vivo* nos produits dans de véritables fistules chroniques, créées dans le dos des rats. Les objectifs de ce projet sont:

- 1) Valider la capacité de nos produits à réticuler après injection dans des fistules
- 2) Après plusieurs semaines d'implantation, étudier l'invasion cellulaire dans nos produits et la guérison des fistules dorsales (fermeture)

- 3) Comparer à l'invasion cellulaire dans des produits déjà commercialisés pour la réparation de fistules. Il s'agira de procédures expérimentales dont les bases ont été publiées et/ou utilisées par d'autres groupes pour la validation pré-clinique de dispositifs médicaux pour le traitement de fistules. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 66 rats. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée :

- 1) Remplacement: autant que possible nous effectuerons des études *ex vivo*, utilisant des organes d'animaux sacrifiés et des abats de boucherie.

- 2) Réduction: le nombre d'animaux utilisé a été rationalisé au maximum tenant compte, quand applicable, des analyses statistiques qui seront effectuées;

- 3) Raffinement: tous les animaux seront anesthésiés pour ces procédures ou pour les chirurgies, 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.

17052 La perte des gaines de myéline entourant les axones dans le cerveau et la moelle épinière provoque de graves troubles locomoteurs et de lourds handicaps. Ces pathologies démyélinisantes, telle que la

sclérose en plaques, sont causées par des problèmes de conduction nerveuse le long des axones, entraînant des troubles du mouvement, de la vision, de la mémoire, et pouvant aller jusqu'à un handicap irréversible, pour lequel aucun traitement médical efficace n'est disponible. L'objectif principal de ce projet est de comprendre le rôle d'une protéine issue du gène Liver X Receptor b (LXRb).

Cette protéine est impliquée dans le métabolisme du cholestérol. Pour ce projet, nous utiliserons des souris transgéniques invalidées pour ce gène spécifiquement dans certaines cellules du cerveau responsables de la mise en place et du maintien de la myéline.

Nous envisageons donc d'étudier et de décrire leur phénotype en menant des études comportementales, biochimiques et histologiques à partir d'animaux transgéniques spécifiquement invalidés pour LXRb dans les oligodendrocytes.

- A 30 jours de vie, quand les souris ont développé des capacités locomotrices quantifiables, ainsi qu'à l'âge adulte, les souris transgéniques subiront des tests comportementaux : test de marche sur poutre pour évaluer la qualité de la coordination locomotrice ; test de rotarod pour évaluer la qualité générale de l'équilibre, de la coordination sensorimotrice, de l'endurance ainsi que de l'apprentissage moteur et le couloir d'analyse des troubles de la locomotion et de l'équilibre pour mettre en évidence de façon plus précise les troubles de la coordination lors de la marche.

- Certaines souris seront ensuite utilisées pour l'analyses histologiques des tissus d'intérêt en postmortem.

Au total nous avons donc besoin de 180 animaux pour une étude qui s'étend sur 5 ans. Afin d'être en conformité avec les exigences des 3R, nous allons utiliser le minimum d'animaux en expérimentation en prélevant le maximum de tissus biologiques sur chaque animal et en utilisant les tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous allons également raffiner l'étude en évitant des tests comportementaux douloureux, en réduisant la durée de l'étude au maximum et en appliquant des points limites, prévoyant la mise à mort des souris en cas de souffrance majeure. Les animaux disposeront de coton pour enrichir leur environnement. Bien que les processus de myélinisation font intervenir de nombreux mécanismes ne pouvant s'analyser que chez l'animal et ne sont pas modélisables *in vitro*, certains aspects de l'action de LXR, concernant plus les mécanismes moléculaires que la physiologie, pourront être étudiés par l'utilisation de modèles cellulaires en remplacement.

Une meilleure compréhension de l'importance de cette protéine permettrait le développement de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement de maladies démyélinisantes, telle que la sclérose en plaques.

17053 Ce projet intitulé « monitoring du métabolisme intratumoral par des microbiocapteurs enzymatiques » est un projet de recherche fondamentale d'une durée de quatre ans. Il consiste à détecter l'oxygène, le glucose et le lactate au sein de tumeurs *in vivo* chez la souris. Les cellules de notre corps utilisent des nutriments présents dans le liquide interstitiel pour produire l'énergie nécessaire à leur fonctionnement. Ces nutriments sont principalement le glucose, mais aussi, dans une moindre mesure les acides aminés. Les cellules qui constituent les tumeurs cancéreuses utilisent différemment ces nutriments. Elles utilisent notamment le glucose pour le transformer en lactate, par un ensemble de réactions appelées glycolyse anaérobie ou fermentation lactique, qui consomme rapidement le glucose présenté aux cellules cancéreuses. Par conséquent, la composition du milieu interstitiel intratumoral est supposée différente de celle d'un tissu normal, avec probablement de faibles concentrations de glucose et de fortes concentrations de lactate. La connaissance de la composition chimique du milieu interstitiel intratumoral est importante car une grande partie de la recherche en cancérologie est menée à l'aide de cellules cancéreuses cultivées dans un milieu nutritif artificiel non relevant. Pour garantir le caractère prédictif de ces études menées *in vitro*, il est important que le milieu de culture des cellules soit le plus proche possible du milieu interstitiel présent *in vivo*.

Au cours de ce projet, 56 souris mâles et femelles recevront une injection de cellules cancéreuses humaines sous la peau du crâne et développeront une tumeur pendant environ 2 semaines jusqu'à une taille de 5 mm. L'injection aura lieu sous anesthésie locale. Le bien-être de l'animal sera évalué quotidiennement. En cas d'infection ou de souffrance de l'animal, des traitements analgésiques

supplémentaires seront administrés et en dernier recours, l'animal sera euthanasié si un point limite est dépassé. La taille de 5 mm visée dans le cadre de ce projet est bien inférieure à la taille limite habituelle autorisée en cancérologie et ne devrait pas induire de souffrance notable impactant le comportement de l'animal. Une fois que la tumeur aura atteint la taille requise, l'animal sera anesthésié et recevra un traitement analgésique. Des micro-capteurs chimiques seront implantés au sein de la tumeur. Ces micro-capteurs sont des électrodes de 10-15 µm de diamètre, très peu invasives, qui permettent d'effectuer une mesure de la concentration d'oxygène, de glucose ou de lactate dans le milieu interstitiel intratumoral. Ces mesures seront effectuées à différentes profondeurs (de 0 à 2500 µm par pas de 500 µm) dans la tumeur pour caractériser d'éventuelles différences de concentrations entre l'extérieur et le centre de la tumeur. Lorsque ces mesures seront terminées, le micro-capteur sera retiré et calibré, et l'animal sera euthanasié sans réveil.

Réduction du nombre d'animaux : ce projet impliquera 56 souris adultes mâles et femelles. Le nombre d'animaux utilisés au cours du projet est maintenu à un niveau minimal permettant des analyses statistiques nécessaires à l'établissement de conclusions fiables.

Raffinement des procédures expérimentales : les animaux inclus dans ces procédures seront traités contre la douleur avec des analgésiques locaux et systémiques, les enregistrements seront réalisés sous anesthésie générale. L'état général des animaux sera évalué quotidiennement.

Remplacement par des procédures *in vitro* : le processus de développement des micro-capteurs dans notre laboratoire passe par une étape préliminaire *in vitro* au cours de laquelle les dispositifs sont testés sur des foies de rats fixés qui présentent notamment une résistance et une rigidité comparables aux tumeurs de souris. Le recours à l'animal est ainsi évité dans toute la partie initiale du développement des dispositifs, mais ne peut pas être entièrement remplacé dans l'état actuel de nos connaissances. De plus, ce projet permettra à l'avenir d'améliorer les procédures de recherche *in vitro* susceptibles de remplacer en partie l'expérimentation animale en cancérologie.

Mots clés : cancer, tumeur, métabolisme

17054 Parmi les moyens thérapeutiques en cours de développement, les implants médicamenteux biodégradables pourraient présenter de nombreux avantages tels qu'une action local prolongée par la libération contrôlée d'un principe actif, une proximité directe de la cible assurant une efficacité optimale, un contrôle de la quantité de médicament circulant et ainsi réduire les effets secondaires et encore une élimination naturelle et contrôlée de l'implant.

De nombreuses applications peuvent être envisagées. Cependant, le cas le plus favorable semble être la mise en place d'un implant biodégradable associé (chimiquement lié) à un médicament anticancéreux en lieu et place d'une tumeur excisée chirurgicalement. Une telle intervention pourrait prévenir une rechute et sa forme résorbable présentant un intérêt certain lors des chirurgies invasives.

Pour le développement des implants médicamenteux biodégradables, toutes les précautions ont été mises en œuvre et les méthodes alternatives mises en place pour évaluer au préalable l'innocuité, la biodégradabilité et l'efficacité de stockage et de relargage de composés pharmacologiques des implants biodégradables et ainsi sélectionner les plus prometteurs.

Notre objectif est d'évaluer l'innocuité puis l'efficacité, chez la souris, de nouveaux types d'implants biodégradables sélectionnés pouvant être chargé d'un médicament.

Dans un premier temps, cette démarche a pour but d'identifier tout effet indésirable lié à une intolérance des implants et/ou une toxicité locale du médicament associé puis de mesurer leur capacité à libérer le médicament de manière plus ou moins progressive et à une dose thérapeutique.

L'innocuité et l'efficacité des implants seront étudiés après implantation sous cutanée pour pouvoir assurer un suivi efficace des implants au cours du temps. Tous les implants dont l'innocuité ne sera pas avérée verront leur développement stoppé.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : Pour réaliser ce projet, l'innocuité des implants sera évaluée chez la souris, car c'est l'espèce qui sera utilisée pour les études pharmacologiques qui suivront dans le développement des implants médicamenteux.

A ce jour, aucun modèle moléculaire et/ou cellulaire n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre de reproduire l'ensemble des phénomènes biologiques et immunitaires impliqués dans les mécanismes de dégradation, d'élimination et de rejet des implants pouvant affecter l'innocuité, la biodégradabilité, la pharmacocinétique et l'efficacité des médicaments associés. C'est pourquoi une approche chez l'animal reste indispensable pour le développement d'un implant médicamenteux.

Raffiner : La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance de l'animal. Les souris seront maintenues en groupes sociaux, dans un environnement enrichi de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude avec un suivi régulier des animaux. L'implantation sous cutanée des implants est réalisée sous anesthésie générale et la souris est ensuite placée sur un tapis chauffant afin de prévenir une hypothermie durant son réveil. Afin de réduire la douleur liée à l'implantation sous cutanée, les animaux recevront un traitement analgésique pré et post-opératoire.

Les animaux seront particulièrement surveillés après l'implantation et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux (évolution pondérale, l'apparence physique général, le comportement) sont mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux. La mise en évidence de tout trouble indiquant que la douleur et l'inconfort lié à l'implantation ne se résorberait pas rapidement, dans les premières 24h, sera suivi de l'arrêt de la Procédure.

Réduire : Seuls les implants sélectionnés sur un ensemble de modèles alternatifs, dont l'efficacité et leur innocuité a été appréciée sur les modèles cellulaires et possédant les caractéristiques physicochimiques adaptées seront évalués chez l'animal.

La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une évaluation efficace de l'innocuité d'un implant à l'aide de 4 à 8 souris, en fonction des paramètres mesurés. Pour les implants médicamenteux, le suivi pharmacocinétique sera réalisé sur 3 animaux à l'aide de petits prélèvements de sang répétés. Il est prévu d'évaluer l'innocuité de 80 implants sur une période de 5 ans, soit un maximum de 880 souris.

17055 La toxoplasmose est une infection parasitaire causée par un protozoaire intracellulaire, *Toxoplasma gondii*. Dans la majorité des cas d'infection humaine, la toxoplasmose est une maladie asymptomatique. En effet, le système immunitaire permet un ralentissement de la vitesse de multiplication du parasite qui va former des kystes tissulaires dans différents types de tissus, tels que le cerveau ou le cœur. Cependant, chez les immunodéprimés, une réactivation du parasite peut être observée, menant à des formes plus graves : l'encéphalite et la rétinopathie, due à des lésions au niveau de la rétine. De plus, chez la femme enceinte séronégative, une infection à *T. gondii* peut provoquer des malformations du fœtus au niveau de l'œil et du cerveau, voire un avortement. L'infection humaine se fait principalement par voie orale, soit par ingestion d'oocystes extrêmement résistants, rejetés par les chats et autres félinés (hôtes définitifs, HD) dans l'environnement, souillant fruits, légumes ou eau de boisson ; soit par consommation de viande crue ou mal cuite contenant des kystes tissulaires présents dans les viandes d'animaux de bétail ou de gibier (hôtes intermédiaires, HI).

Il est connu que les tiques peuvent transporter de l'ADN de *T. gondii*, allant jusqu'à 64,9% des tiques récoltées dans une étude polonaise. Cependant, leur capacité ou non à transmettre *T. gondii* reste toujours à confirmer. Or, au vu du risque majeur que constituent les tiques pour la santé humaine et animale, il nous semble important d'étudier les capacités vectorielles de la tique *Ixodes ricinus* face à *T. gondii*, ce qui constitue l'objectif du présent projet.

Pour cela, nous nous proposons d'évaluer la capacité de l'arthropode à acquérir, conserver et transmettre le protozoaire à un mammifère (souris domestique), via différentes voies de transmission.

Pour répondre à ces questions, dans un premier temps, nous évaluerons la compétence de transmission mécanique de *T. gondii* infectieux par l'arthropode *I. ricinus*. Puis nous testerons l'acquisition de *T. gondii* infectieux par l'arthropode *I. ricinus* lors d'un repas sanguin sur souris infectée. Ces deux premières procédures nous permettront de connaître la proportion des tiques infectées mais également la durée de la parasitémie au sein de la tique afin de mener à bien les expériences

concernant la transmission de la larve à la nymphe, la transmission de la nymphe à l'adulte (transmission inter-stadiale) et respectivement la transmission trans-ovarienne (de l'adulte femelle aux œufs).

Nous allons utiliser au maximum 686 souris (*Mus musculus*) dans le respect de la règle des « 3R » : les expériences seront d'abord testées sur un nombre limité d'animaux, uniquement en cas des résultats négatifs des animaux supplémentaires seront testés dans les mêmes conditions. De plus, le nombre de tique par souris sera maximisé pour réduire le nombre de souris nécessaire mais toujours dans l'évitement des souffrances pour l'animal. Surtout, les tiques seront infectées avec des capillaires et non grâce à des repas sanguins sur animaux, afin de réduire l'utilisation de souris. De plus le génotype de *Toxoplasma gondii* utilisé comme source d'infection est de type II, étant une souche peu virulente chez la souris. En cas de signes cliniques limites, 72h après l'inoculation, (fourrures ébouriffées, dos voûté) laissant supposer une atteinte toxoplasmique, un traitement à l'adiazine (traitement anti-toxoplasmique) sera institué ad libitum. Si toute fois, nous observons une altération profonde de l'état général des souris, malgré le traitement anti toxoplasmique, alors celles-ci seront euthanasiées via l'utilisation de doses croissantes de CO₂ et autopsiées (recherche de toxoplasme). Normalement, pour les souris, l'alimentation des tiques induit un inconfort modéré. Mais ces animaux peuvent simplement se sentir mal à l'aise lorsque la capsule est placée sur leur dos. Cependant, le placement des capsules sur le dos de l'animal a été optimisé pour minimiser l'inconfort chez l'animal et maximiser les résultats expérimentaux. Cependant, l'expérience sera interrompue si des événements indésirables se produisent, par exemple :

(i) Si un animal est trouvé en état de choc anaphylactique en raison de morsures de tiques.

(ii) Si un animal se retrouve avec des blessures auto-infligées par des tentatives de retrait de la capsule.

Enfin, les souris recevront des enrichissements afin d'améliorer leur bien-être, comme une maisonnette en plastique, des bâtonnets en bois, du coton.

17056 La mortalité liée à l'hospitalisation en réanimation a diminué au cours des dernières décennies. Cependant, il n'existe que peu de données scientifiques sur les effets à long terme des agents anesthésiques généraux utilisés dans ces unités. La question de la neurotoxicité de ces agents, ciblant le système nerveux central, s'est imposée dans les débats public et scientifique : différents éléments font suspecter un impact délétère à long terme de l'exposition à des agents anesthésiques, en particulier chez l'enfant.

Des données récentes montrent une association entre l'utilisation ponctuelle d'agents anesthésiques chez l'enfant et troubles du neuro-développement, d'autant plus forte que l'exposition est précoce ou que le temps d'exposition est prolongé. Le concept du syndrome post réanimation pédiatrique met en évidence l'impact délétère d'une anesthésie prolongée sur le neuro-développement chez les enfants ayant été hospitalisés en réanimation. Il englobe des symptômes comme des troubles de l'apprentissage, des syndromes de choc post traumatique et des troubles psychomoteurs, dont les principaux facteurs de risque sont une sédation prolongée et les hallucinations sous agents pharmacologiques. Il n'existe pas d'explication physiopathologique univoque.

Récemment a été découvert un système de nettoyage des déchets métaboliques du cerveau appelé glymphatique. Ce système est immature dans l'enfance et son activité est diminuée lors d'une anesthésie générale. Par ailleurs la mise en place de la vascularisation cérébrale débute au stade embryonnaire et se poursuit dans les premiers jours de vie, avec l'évolution vers un réseau mature dans les premiers jours de vie. Ce processus est concomitant de la neurogenèse et peut être perturbé dans des situations pathologiques telles que l'autisme.

Notre hypothèse est qu'une anesthésie générale prolongée juvénile peut entraîner, à distance de l'exposition, une modification persistante du flux glymphatique et du flux sanguin associée à une altération de l'évaluation cognitive et comportementale chez les jeunes animaux.

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 :

- Le modèle *in vivo* est indispensable pour étudier les effets de l'anesthésie sur le cerveau en développement et la réalisation d'une étude longitudinale sur plusieurs mois. La souris est l'espèce

animale chez qui le système glymphatique a été le plus étudié et le mieux connu. Elle est également le modèle privilégié utilisé en recherche pré-clinique sur l'anesthésie juvénile. Il n'existe pas de modèle de substitution *in vitro*.

- Le nombre de souris nécessaires a été déterminé au moyen de 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. Les animaux utilisés seront des souris SWISS mâles juvéniles puis adultes, le nombre total d'animaux prévu est de 250 (220 souriceaux et 30 gestantes).

- Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les week end et jours fériés. Ils seront hébergés dans des cages standards aux normes européennes. L'animal sera immédiatement soigné s'il présente des blessures légères. Si un animal montrait des signes cliniques de souffrance (perte > 10% du poids initial, apathie ...), il serait immédiatement retiré du protocole et mis à mort selon la procédure « mise à mort » décrite dans le paragraphe 3.3.3

17057 Selon les dernières projections de l'Organisation Mondiale de la Santé, on estime à 13 millions le nombre de décès qui seront imputables au cancer en 2030. Cette pathologie très diversifiée au pronostic très sombre nécessite le développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques pour améliorer la prise en charge des patients. En cancérologie, les biomarqueurs présents sur les cellules métastatiques peuvent être différents de ceux présents sur les cellules de la tumeur primaire. Il est donc primordial de disposer du phénotype des métastases pour adapter le traitement à leurs caractéristiques moléculaires. La biopsie est un élément clé du diagnostic des métastases; elle consiste à prélever un échantillon d'un tissu suspect pour en réaliser l'analyse microscopique voire immunohistopathologique. Cette technique permet le diagnostic initial mais comme elle est invasive, elle est rarement utilisée dans le suivi thérapeutique. De plus, toutes les métastases ne sont pas accessibles à la biopsie: leur phénotypage doit donc être envisagé de façon non invasive.

L'imagerie médicale est aujourd'hui un des principaux outils peu invasifs de détection des lésions cancéreuses. Elle permet d'obtenir des images des organes, plus ou moins sensibles et spécifiques selon la technique employée, et de visualiser ainsi les éventuelles tumeurs macroscopiques. La médecine nucléaire est une spécialité médicale reposant sur l'utilisation de molécules d'intérêt couplées avec des radioisotopes, également appelées radiotraceurs ou radiopharmaceutiques en pratique clinique. En oncologie, ces molécules peuvent être utilisées à des fins diagnostiques (imagerie phénotypique des métastases ou des tumeurs primaires) ou thérapeutiques (radiothérapie interne). On qualifie alors cette approche de « théranostique ». L'approche théranostique est récente, mais extrêmement prometteuse. Un premier médicament radiopharmaceutique théranostique a été récemment mis sur le marché aux États-Unis et en Europe, et de nombreuses autres molécules sont en cours de développement préclinique.

Les traceurs radioactifs que nous développons, obéissent à la même législation que les médicaments, et sont d'ailleurs appelés médicaments radiopharmaceutiques. La première étape de leur développement est une preuve de concept (POC) préclinique réalisée chez le rongeur. La sélection du radiotraceur est déterminée par les profils de biodistribution préalablement réalisés chez le rongeur. Son innocuité (en termes d'accumulation non-spécifique dans les organes non-cibles), sa spécificité vis-à-vis de la cible (chez des animaux porteurs de tumeurs), et son profil d'élimination rapide dans les tissus sains permettent ainsi de valider que cette molécule candidate est pertinente. Mais il peut y avoir des erreurs de biodistribution chez un modèle rongeur. C'est pourquoi, avant le passage en phase clinique, la deuxième étape consiste à pousser les investigations chez une espèce animale physiologiquement encore plus proche de l'homme. Cette POC doit être confortée par une étude d'imagerie, non-invasive chez le primate non humain (PNH) avant le passage à l'homme : c'est l'objet de ce projet. Si les études de biodistribution chez le PNH donnent des résultats satisfaisants, la molécule sera transférée en clinique, dans le cadre de Phases I-IIa (troisième étape d'un développement de molécules médicaments)

Principe de Remplacement: L'évaluation de ce paramètre est donc primordiale et ne peut s'effectuer que chez l'animal possédant les caractéristiques physiologiques les plus proches de celles de l'humain.

C'est pourquoi dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier, chez le primate non humain, la biodistribution d'un radiotracer ciblant les cellules cancéreuses. Ces images seront réalisées chez des animaux sains non porteurs de tumeurs. L'objectif est de s'assurer en amont de son transfert clinique, sur cette espèce proche de l'homme, que la molécule ne s'accumule pas dans des organes non cibles, et qu'elle pourrait donc être pertinente pour cibler des tumeurs sans modifier les tissus sains. Ce projet étudie l'organisme en entier et il est donc impossible de remplacer notre projet par un modèle cellulaire ou computationnel.

Principe de Réduction: Cette étude pilote sera réalisée sur, au maximum, 4 singes *Macaca fascicularis*, ce qui constitue un nombre minimum pour obtenir des données exploitables. Cette étude consiste en 2 procédures de classe légère, 1- mise au point des paramètres de l'imageur nucléaire utilisé en clinique humaine, adaptés à la taille du corps du PNH, 2- évaluation d'un nouveau radiotracer par imagerie nucléaire. Il s'agit de 2 procédures de classe légère, utilisant l'imagerie nucléaire; les animaux seront anesthésiés durant l'ensemble de la procédure. Ils ne seront pas mis à mort après l'imagerie et pourront être inclus dans un nouveau projet avec l'accord du vétérinaire référent.

Principe de Raffinement: Cette séance d'imagerie de classe légère pour le PNH se déroulera sur une seule journée de vie de l'animal et correspond à un examen d'imagerie médicale fait classiquement chez le patient. L'animal sera anesthésié tout le long de l'examen. Pendant l'hébergement, les animaux sont regroupés en fonction de leurs affinités, ils peuvent ainsi avoir des interactions sociales réconfortantes comme l'épouillage. Un programme d'enrichissement du milieu est assuré par le zootechnicien référent. Il a pour but de familiariser les singes aux expérimentateurs, de leur apprendre à coopérer pour les déplacements et pour les soins et enfin il a aussi pour but de diminuer l'ennui que peut générer la captivité. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et sera 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.

17058 En Europe, les cancers pédiatriques sont la première cause de mortalité infantile non accidentelle. 20% des enfants et adolescents diagnostiqués meurent encore chaque année et bien que 80% survivent, les deux tiers d'entre eux souffrent sur le long terme, d'effets secondaires associés à un traitement souvent non adapté. Le développement de thérapies efficaces en oncologie pédiatrique est donc aujourd'hui devenu un enjeu majeur.

Ces dernières années, grâce à l'avancée des thérapies ciblées, une augmentation très importante de nouvelles drogues approuvées pour le traitement des cancers chez l'adulte a été enregistrée. En comparaison, seuls 2% du budget de la recherche sont alloués pour lutter contre les cancers pédiatriques et il existe peu d'options thérapeutiques accessibles aux enfants et adolescents atteints de cancers. Pour pallier à ce retard, un appel d'offres a été lancé pour favoriser la création d'une plateforme unique regroupant chercheurs, médecins, industriels, associations de parents et commission européenne, et permettre le développement de systèmes de criblages performants dans le but de tester de nouvelles molécules ou des molécules développées ou en cours de développement chez l'adulte qui pourraient aussi être efficaces chez l'enfant.

Dans le cadre de la mise en place de cette plateforme, notre société est chargée de finaliser le développement de modèles de tumeurs humaines xénogreffées sur souris ou Patient Derived Xenografts (PDX) représentant au mieux l'hétérogénéité et la variété des cancers pédiatriques solides. Ces modèles seront utilisés pour réaliser des "mouse trials" afin de dégager les meilleures thérapies potentielles dont pourraient bénéficier les enfants et les adolescents malades.

Le développement de modèles PDX est indispensable car ces modèles sont les seuls permettant de reconstituer la complexité des tumeurs humaines et bien que l'environnement cellulaire qui entoure les greffons est constitué de tissus de souris, ce sont sans doute les modèles qui s'approchent le plus de la maladie humaine. Ces PDX sont donc, à l'heure actuelle, les outils les plus performants pour mimer les réponses observées chez les patients en clinique et établir une liste des meilleurs traitements potentiels pour lutter contre les cancers pédiatriques.

Après concertation, l'ensemble des collaborateurs de ce projet ont opté pour la réalisation de "mouse trials". Les "mouse trials" sont des études précliniques permettant d'évaluer, sur un nombre réduit de

souris (n=1), l'efficacité et la toxicité de molécules sur une large cohorte de modèles de PDX. Parmi un très grand nombre de molécules à tester, incluant de nouvelles molécules ou des molécules développées ou en cours de développement chez l'adulte, et dont l'efficacité doit être démontrée chez l'enfant, les "mouse trials" sont une première étape vers l'identification des traitements les plus efficaces pour l'ensemble des cancers pédiatriques. Ce format d'étude permettra de réduire le champ d'investigation en diminuant le nombre important de molécules à tester dans des études précliniques plus approfondies et donc de réduire le nombre global d'animaux utilisés.

Les souris seront regroupées au minimum par deux et au maximum par six dans des cages changées fréquemment et manipulées dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal. Les animaux seront monitorés quotidiennement (état physique et comportement) et le milieu est systématiquement enrichi avec du papier kraft. Des bâtons de bois et des maisons en carton pourront être ajoutés.

Le nombre d'animaux utilisé (7200) sera le minimum requis afin de développer 80 modèles PDX sur 2 ans et dégager le plus grand nombre de molécules potentiellement efficaces qui pourront ensuite être développés en thérapies adaptées pour lutter activement contre l'ensemble des cancers pédiatriques solides.

17059 RÉSUMÉ NON TECHNIQUE

1- Contexte scientifique et médical du projet : La contraction d'un muscle est consécutive à l'envoi d'un signal du cerveau se transmettant via les neurones. L'extrémité du nerf au contact du muscle est dénommée la jonction neuromusculaire : c'est là que le signal provenant du cerveau doit être transmis au muscle. Le signal nerveux induit ainsi à ce niveau la production et la libération des molécules qui vont se fixer sur des récepteurs localisés à la surface du muscle, entraînant le déclenchement d'une cascade d'évènements menant à la contraction musculaire. Dans certaines maladies génétiques telles que les myopathies, le problème se situe justement au niveau de la transmission de ce signal précisément au niveau de la jonction neuromusculaire.

2- Objectifs du projet : Nos travaux sont destinés à identifier les composants impliqués dans le processus de transmission du signal du nerf au muscle et à comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu. Ces analyses permettront aussi de définir les étapes altérées dans les différentes pathologies associées au dysfonctionnement de la jonction neuromusculaire.

Notre projet se focalise plus précisément sur l'activation de la production d'un facteur contrôlant le niveau d'expression de certains gènes importants pour le déclenchement de la cascade de réactions mentionnée ci-dessus. La compréhension de ces mécanismes permettra de définir les étapes au niveau desquelles il faudra s'intéresser pour définir des traitements ciblés en fonction des différentes pathologies étudiées. Nous avons estimé à 5 ans la durée nécessaire pour effectuer toutes les analyses mais il est probable que des résultats intermédiaires soient obtenus permettant des avancées significatives (associées à une publication) avant le terme des 5 ans.

3- Balance dommages/bénéfices : Cette étude ne peut être conduite que sur un organisme entier car il est actuellement impossible de reproduire *in vitro* une jonction neuromusculaire. La souris est le modèle idéal pour cette analyse car les processus étudiés sont très conservés au cours de l'évolution en particulier chez les mammifères. La technique d'électroporation/dénervation qui va être mise en œuvre présente l'avantage d'être peu invasive : elle cause très peu de dommages et quasiment aucune séquelle chez les animaux traités. La procédure est par ailleurs effectuée avec le maximum de précautions pour limiter la souffrance des animaux (anesthésie, anti-douleurs). Brièvement, après anesthésie de la souris, le gène à étudier est injecté dans le muscle des pattes postérieures et la dénervation est effectuée sur l'une de ces pattes par micro-chirurgie. La combinaison de ces 2 techniques permettra d'obtenir des informations essentielles pour comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu et d'en déduire des thérapies adaptées aux maladies liées à un défaut de la transmission du signal nerveux au muscle comme les myopathies.

Au vu des bénéfices attendus en termes scientifique et médical et de l'impact très limité sur les souris, nous estimons que cette étude sera extrêmement rentable pour la société.

4- Conformité avec la règle des 3R : Comme précisé précédemment le recours aux animaux, ici des souris, est indispensable non seulement car on ne peut reproduire *in vitro* une jonction neuromusculaire fonctionnelle mais aussi parce que la dénervation induit des modifications physiologiques sur l'ensemble du muscle qu'il est évidemment impossible de constater sur des cellules en culture. Néanmoins il sera possible de faire des tests préliminaires sur cellules pour certaines mises au point de nos analyses, permettant de ne recourir aux animaux que lorsque c'est absolument nécessaire.

Étant donné le nombre de formes différentes de gènes à étudier (comprenant délétions et mutations ponctuelles) et en prenant en compte les contrôles indispensables, nous avons calculé que 13 groupes de 12 souris, donc 156 souris au total, étaient nécessaires pour obtenir un résultat statistiquement valable.

Grâce aux précautions prises pour l'anesthésie générale ainsi que les mesures médicamenteuses analgésiques et anti-inflammatoires pratiquées en pré et post-opératoire, les souris traitées retrouvent très rapidement un comportement similaire à leur congénère non traité. Les animaux sont ensuite surveillés 3 fois par semaine pour détecter d'éventuels problèmes (apparence, comportement social, posture, perte de poids) et y remédier par des soins appropriés. Par ailleurs, pour faciliter l'alimentation des souris dénervées qui pourraient présenter une difficulté en raison de l'absence temporaire de réactivité de la patte dénervée, la nourriture sera placée de façon plus accessible dans la cage.

5- Informations complémentaires

Dans la mesure du possible nous prévoyons d'utiliser des animaux qui n'ont pas été utilisés dans d'autres projets (souris qui ne présentent pas les caractéristiques requises pour la poursuite de ces projets et qui seraient dès lors éliminées).

Par ailleurs des prélèvements effectués sur ces animaux (cœur, diaphragme, autres muscles, etc ...) seront également mis à profit pour des analyses nécessaires à d'autres projets au sein de notre équipe permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés.

17060 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.

17061 Les démences séniles représentent un problème médical et social majeur affectant la santé des personnes âgées. La maladie d'Alzheimer et les démences vasculaires sont les deux types cliniques les plus courants de démences. Les solutions thérapeutiques contre les démences sont actuellement inexistantes. Le modèle animal le plus utilisé pour étudier la physiopathologie et le traitement des démences est celui de l'hypoperfusion cérébrale chronique. En effet, une littérature abondante montre que ce modèle récapitule plusieurs phénomènes observés chez les patients atteints de démences, y compris les altérations du tissu cérébral et les déficits cognitifs.

Bien que les irradiations ionisantes, appliquées à fortes doses, soient délétères pour les cellules, une exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants (FDR) pourrait au contraire promouvoir des réactions cellulaires bénéfiques permettant la protection et la réparation tissulaires. Ainsi, il a été montré par exemple que les FDR stimulent l'angiogenèse et améliorent la perfusion sanguine après une ischémie de la patte. Dans le présent projet, nous émettons l'hypothèse selon laquelle les FDR protègent le cerveau et réduisent les déficits cognitifs à la suite d'une hypoperfusion cérébrale chronique chez le rat.

Les études seront réalisées en suivant le principe des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer). Raffiner : les animaux seront hébergés aux normes requises ; 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'anxiété 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 rat représente un modèle de choix pour étudier les effets de l'irradiation sur le cerveau et sur les performances cognitives. Le nombre estimé d'animaux utilisés est de 80 rats répartis en 5 groupes.

17062 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.

17063 La peur est une réponse adaptative et transitoire exprimée lorsqu'un sujet est exposé à un danger. Cependant, la peur peut devenir élevée et continue en absence de danger, devenant alors un trouble psychiatrique dénommé anxiété. Cette pathologie constitue la condition psychiatrique possédant la plus forte prévalence. Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2007, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes en France présentent des troubles d'anxiété généralisés. L'anxiété représente ainsi un coût sociétal et économique majeur.

Une hypothèse propose que des dysfonctionnements des circuits impliqués dans l'encodage de la valence sont à l'origine de l'anxiété malade. Le projet vise à définir l'implication de l'encodage de la valence dans les troubles anxieux, au travers de l'étude d'une région cérébrale spécifique qui a été impliquée dans les troubles anxieux chez l'humain : le cortex insulaire. Au travers d'analyses de la connectivité, de manipulations et d'enregistrements de l'activité neuronale, nous avons pour objectif de mettre en évidence les altérations des circuits d'encodage de la valence dans un modèle d'anxiété chez la souris.

Ce projet a pour but de mettre en évidence des altérations du fonctionnement de circuits neuronaux contrôlant le niveau d'anxiété, afin de pouvoir envisager des stratégies de restauration de ces altérations chez les patients atteints de troubles anxieux.

Remplacer : Le projet porte sur une analyse de la connexion des neurones et de leurs propriétés de transmission d'informations au cours du comportement. Par conséquent cette procédure doit être effectuée chez des animaux vivants. Des méthodes telles que la culture cellulaire ne permettent pas la quantification des connexions neuronales ou la mesure de l'activité en réponse à une stimulation sensorielle *in vivo*.

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux afin d'obtenir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques) et complète de la connectivité et de l'activité de la région cérébrale d'étude. Nous utiliserons ainsi 1152 animaux sur cinq ans.

Raffiner : Avant la mise en place du modèle d'anxiété, les animaux seront hébergés en cages collectives, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les cages seront également enrichies en nids en coton. Une surveillance particulière sera adressée aux animaux en période péri-opératoire. L'acte chirurgical sera effectué dans des conditions de propreté maximales. Des antibiotiques et analgésiques seront administrés en cas d'infection ou de douleur.

17064 L'alcoolodépendance est une maladie chronique et hautement récidivante en dépit des thérapies existantes puisque 70% des patients rechutent après 12 mois de prise en charge (plus de 90% après 4 ans). Les mécanismes neurobiologiques impliqués dans la perte de contrôle sur la consommation d'alcool sont encore mal connus et trop peu de médicaments sont actuellement disponibles pour le traitement de l'alcoolodépendance et des troubles de la consommation d'alcool. Certaines structures cérébrales ainsi que certains systèmes de neurotransmission ont tout de même été identifiés comme étant des acteurs clés des addictions en général et de l'alcoolodépendance en particulier. Ces systèmes de neurotransmission sont le système dopaminergique et le système glutamatergique qui communiquent entre eux au travers de structures impliquées dans le circuit de la récompense (noyau accumbens, striatum dorsal, cortex préfrontal). Ces 2 systèmes sont de plus régulés par le système endocannabinoïde. Nous avons d'ores et déjà identifié un certain nombre de cibles moléculaires d'intérêt comme par exemple le récepteur D3 de la dopamine, le récepteur H3 de l'histamine, les récepteurs des endocannabinoïdes ou encore les récepteurs canaux au glutamate (NMDA, AMPA) mais certaines nouvelles pourront se présenter à nous au cours de ce projet. Nous estimons devoir tester une dizaine de molécules au cours du projet décrit ici. Ainsi nous envisageons donc de tester au maximum 10 molécules pour ensuite se concentrer sur les 5 plus intéressantes. Dans ce contexte de recherche de nouveaux traitements, nous proposons de réaliser un projet qui permettra d'évaluer l'efficacité d'une dizaine de molécules dans différents aspects de la pathologie des troubles de la consommation d'alcool. Ces aspects (consommation, motivation, rechute, bases neurobiologiques...) seront donc étudiés grâce à la mise en œuvre des différentes procédures qui sont donc complémentaires. Les molécules testées seront de la famille des modulateurs de l'activité des neurotransmetteurs principaux ou des facteurs de modulation de la réaction inflammatoire. Toutes les molécules que nous testerons auront déjà fait l'objet de test prouvant leur innocuité. Ces molécules seront testées en parallèle sur des rats non-dépendants et sur des rats dépendants. Nous avons choisi pour ce projet le modèle murin (rats Long Evans, Wistar ou Sprague-Dawley) qui est le plus utilisé dans le domaine de la recherche sur l'alcool et qui nous permettra d'étudier des comportements complexes dans un contexte d'autoadministration opérante. A l'heure actuelle, aucune modélisation informatique ou cellulaire n'est disponible pour permettre d'étudier les troubles de la consommation d'alcool. Nous devons donc utiliser la modélisation animale et ici, dans le contexte de l'auto-administration opérante d'alcool, le gold-standard est le modèle « Rat ». Nous allons donc réaliser ce projet en utilisant des rats, aussi bien mâles que femelles car nous savons que les effets des peuvent être différents en fonction du sexe. Pour chacune des procédures présentées, nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux pour nous permettre malgré tout d'obtenir une puissance statistique suffisante à démontrer une différence significative entre 2 groupes. Ce nombre d'animaux est différent d'une procédure à l'autre car la variabilité inhérente au test peut être différente en fonction des tests comportementaux. Les animaux, hébergés seuls, seront surveillés quotidiennement et toute apparition de souffrances/douleurs sera prise en charge par l'administration d'analgésiques (paracétamol, buprénorphine) en adéquation avec les niveaux de souffrance/douleur établis à l'aide de tableaux d'évaluation de la douleur. Au total ce projet propose 11 procédures mais les rats ne seront exposés qu'à 3 procédures consécutives maximum dont les 2 premières ne sont que des procédures de mise en place du modèle. En fonction du type de procédure expérimentale le nombre de rats variera de 15 à 30 rats par groupe pour nous permettre d'obtenir une puissance statistique suffisante et ainsi observer des différences significatives entre les groupes. Un effort particulier dans le design expérimental est fait pour trouver un équilibre entre la non ré-utilisation de rats pour différentes molécules et la concentration de certaines procédures pour au final limiter le nombre d'animaux utilisés dans cette

étude mais qui néanmoins nous permettent une interprétation correcte des résultats observés. Nous allons également mettre en oeuvre des techniques d'études longitudinales (voltamétrie *in vivo*, IRM fonctionnelle) pour nous permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet. Un total maximum de 3365 rats sera utilisé dans ce projet de 5 ans. L'objectif de ce projet global est de comprendre les mécanismes neurobiologiques, qui sous-tendent cette vulnérabilité à passer d'un usage contrôlé (non-dépendants) à un usage compulsif (dépendants). L'obtention de ces données constituerait une étape décisive dans la compréhension de la pathologie et l'identification de cibles thérapeutiques pertinentes. En général nos études visent aussi à fournir la preuve de concept avant de passer aux études de phase 1 en clinique.

17065 En transplantation d'organes, deux types de rejets peuvent survenir, aiguë ou chronique, les deux impliquant l'action des cellules du système immunitaire. Il est maintenant reconnu que la réponse humorale (production d'anticorps anti-donneur) est le principal déterminant du devenir des greffes. Lors de cette réponse, les anticorps sont produits par les lymphocytes B du patient greffé et vont détruire le greffon. A ce jour, les traitements classiques contrôlent encore très mal ce mécanisme de rejet. Des résultats prometteurs ont été obtenus *in vitro* dans notre laboratoire avec l'utilisation d'un nouvel immunosuppresseur montrant qu'il pouvait bloquer la production d'anticorps. Depuis quelques années, nous développons une recherche expérimentale ayant pour objectif de mieux comprendre ces mécanismes.

De ce fait nous avons démontré que ce nouvel immunosuppresseur agirait directement sur les lymphocytes B humains en bloquant la production d'anticorps. Ces résultats obtenus dans un modèle *in vitro* doivent maintenant être validés dans un modèle *in vivo*.

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, nous devons être en mesure d'étudier chez l'animal comment se comportent les cellules immunitaires humaines. Seule la souris immunodéficiente permet l'étude des cellules humaines *in situ* à l'échelle d'un organisme entier.

Notre objectif est de développer un modèle *in vivo* permettant de caractériser l'activation ou le freinage de la réponse à partir de cellules humaines et de comparer différents traitements immunosuppresseurs utilisés classiquement chez l'homme.

Notre étude préliminaire nous a montré la nécessité d'une injection des cellules humaines directement dans la rate (voie intrasplénique) afin de favoriser la bonne reconstitution des cellules d'intérêts, les lymphocytes B. Nous réaliserons donc des injections intra-spléniques de cellules humaines issues du sang (de donneurs sains) à des souris immunodéficientes auxquelles nous ajouterons différents traitements immunosuppresseurs. La mise à mort des souris aura lieu à J21 et différents prélèvements seront réalisés (sang, rate, moelle osseuse) pour l'analyse les cellules qui activent ou freinent la réponse immune.

Des mesures de raffinement seront mises en place pour limiter au maximum le stress des animaux et contribuer à leur bien-être. Pour cela, nous aurons recours à une surveillance quotidienne tout au long de l'expérience avec une observation de l'aspect macroscopique de l'animale (texture du poils, posture, desquamation de la peau) et à la prise de poids trois fois par semaine. Les animaux montrant des signes important de maladie du greffon contre l'hôte (posture voutée, poils hirsutes et atteintes cutanées) ainsi qu'une perte de poids supérieur à 15% du poids initial seront mis à mort.

Pour ce projet nous envisageons d'utiliser un maximum de 144 souris sur 3 ans avec une expérience type pouvant contenir jusqu'à 24 animaux (réalisation d'environ 6 expériences selon l'évolution du projet et l'efficacité des molécules injectées).

17066 Les enseignements pratiques de physiologie animale et de pharmacologie sont prévus dans le Programme Pédagogique National du DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques, publié en 2013. Ces enseignements sont répartis en 1ère et 2ème année de formation.

La succession des TP permet une maîtrise progressive par l'acquisition de gestes précis indispensables en expérimentation animale. Chaque séance se double d'un aspect théorique et d'un aspect technique avec apprentissage des gestes. Les différents travaux abordés sont la mise en place de cathéters et le suivi pharmacologique d'un médicament en première année de formation. Dans ce

cadre, c'est le modèle rat qui est utilisé. En deuxième année de formation, des tests comportementaux et pharmacologiques sont menés chez le modèle souris et rat. Un total de 161 rats mâles Wistar et 755 souris mâles Swiss est utilisé chaque année pour la formation de 154 étudiants soit un total de 805 rats et 3775 souris pour durée totale du projet. Le projet est demandé pour une durée de 5 années.

Les différents enseignements pratiques abordés sont les suivants: Voies d'accès chez le rat anesthésié : Initiation à la pose de cathéter - Etude de la sécrétion biliaire chez le rat - Screening d'antidépresseurs chez la souris - Absorption intestinale des sucres et régulation de la glycémie chez le rat - Etude de l'intestin isolé de souris - Test d'interaction à l'éthanol chez la souris - Modèle Parkinsonien chez la souris - Tests comportementaux pour criblage de molécules chez la souris. Les enseignements pratiques utilisant le modèle rat sont réalisés sous anesthésie générale et une surveillance continue est réalisée afin de s'assurer en permanence de l'absence de signes de réveil. En cas de signe de réveil, une nouvelle dose (de moitié) d'anesthésique sera administrée. Au cours des expérimentations menées sur le modèle souris, les tests comportementaux effectués n'induisent pas de douleur. Néanmoins l'expérimentateur restera vigilant quant à tout signe éventuel de stress, en surveillant la respiration ou d'éventuels signes d'isolement vis à vis de ses congénères. A l'issue de chaque séance de travaux pratiques, les animaux sont mis à mort selon la réglementation en vigueur, soit par injection d'une solution euthanasiante (rats) soit par dislocation cervicale ou administration progressive de CO2 (souris).

Les animaux sont hébergés dans une animalerie contrôlée (température, ventilation, hygrométrie, photopériode) et dans le respect de la méthode des 3R, avec un enrichissement adapté à chaque espèce animale. Le milieu sera enrichi en objets modifiables permettant aux animaux de créer un environnement propice à leur développement et à leur épanouissement. Les soins sont apportés par du personnel qualifié (concepteur et applicateur des procédures expérimentales), dans le respect du bien-être animal. La nourriture est en quantité suffisante pour que les animaux aient un accès à volonté. Les cages utilisées (en plexiglas et munies d'une grille dans sa partie supérieure) permettent une disponibilité à volonté des aliments (bouchons) et de l'eau de boisson.

17067 Une section de nerfs périphériques est couramment observée en clinique avec une grande variabilité de causes : suite à un traumatisme, d'une lésion directe avec un objet coupant ou à des pathologies. Lors d'une lésion nerveuse notamment en cas de lésion complète, il est nécessaire de faire une réparation chirurgicale. A l'heure actuelle, plusieurs stratégies sont proposées, mais aucune ne permet une entière réparation et récupération des fonctions nerveuses. Pour cette raison, la recherche de nouvelle stratégie ou d'amélioration dans ce domaine est très active.

L'une des stratégies actuelles consiste à l'utilisation de tubes faits à partir des différents matériaux pour guider et améliorer la repousse nerveuse. On parle alors de guide de repousse nerveuse. Si certains guides sont déjà utilisés en clinique, ils sont au cœur de plusieurs projets de recherche dont le but est leur amélioration pour un rétablissement du patient sans séquelles. Plusieurs guides de repousse nerveuse sont disponibles avec différents matériaux, structures, facteurs de croissance, mais aucune étude a comparé les effets de ces différentes caractéristiques sur la qualité de la repousse du nerf pour en conclure la meilleure combinaison.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude longitudinale avec des outils non invasifs est la comparaison de l'efficacité de différentes stratégies pour la réparation anatomique et fonctionnelle du nerf sciatique après section de 10 mm. Pour ce faire, nous étudierons les trois stratégies de réparation chirurgicale d'une section de nerf utilisées au quotidien dans les services hospitaliers : 1) par une suture directe, 2) une auto-greffe et 3) par l'installation d'un guide de repousse nerveuse. Pour cette dernière stratégie, 3 guides aux caractéristiques mécaniques différentes dont un guide commercialisé pour l'Homme aux dimensions compatibles pour le rat et deux nouveaux guides mis au point par notre équipe.

Six groupes de 30 rats seront observés au cours du temps en combinant de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), de l'électromyographie (EMG) et un test de comportement : un groupe de rats ayant subi une suture directe, un groupe ayant subi une auto-greffe, un groupe pour chaque guide et un groupe « sham » ayant été opéré mais sans section du nerf sciatique.

Un septième groupe de 5 rats permettra de mettre en place et valider le protocole des tests de comportement et IRM avant le début de l'étude. Au total, 185 rats seront utilisés lors de cette étude.

Nous avons choisi d'utiliser l'IRM et l'EMG lors de cette étude car ces outils non invasifs, présentent l'avantage d'être accessibles dans les services hospitaliers permettant ainsi de nous rapprocher d'un protocole de suivi adaptable et transférable pour les futures études cliniques.

Le projet sera conduit en respectant la règle des 3R visant :

-Réduire : Nous utiliserons le nombre de rats suffisante pour pouvoir faire des études statistiques fiables. Notre choix d'utiliser des techniques non invasives pour cette étude longitudinale nous permet de réduire le nombre d'animaux.

-Raffiner : L'environnement des animaux sera enrichi d'un tunnel rouge utilisé également pour manipuler les rats. Les animaux seront hébergés seuls le temps de la cicatrisation puis par deux. Un suivi quotidien des animaux opérés permettra de s'assurer de leur bien-être avec une attention particulière sur l'état de la plaie lors de la première semaine. Les animaux seront anesthésiés pour chaque chirurgie et recevront un analgésique avant et après la chirurgie. Une grille de score, établie pour soustraire l'animal à la souffrance, sera remplie lors de la visite hebdomadaire. Notre choix d'utiliser des techniques non invasives nous permet également de réduire des sources de stress et de douleur inutiles pour l'obtention de résultats.

-Remplacement : L'étude portant sur le suivi de la réparation du nerf sciatique aussi bien d'un point de vue anatomique que fonctionnelle, nécessite impérativement l'utilisation d'animaux et le modèle de rat est bien étudié et connu.

Nous utiliserons un test statistique non paramétrique adéquat pour les petits effectifs

17068 L'augmentation des émissions atmosphériques de CO₂ et son absorption par les océans entraînent leur acidification, mettant en péril les espèces marines et leurs écosystèmes. En dépit de leur importance économique, écologique et patrimoniale, il existe très peu d'études ayant traité du cas des poissons. Pourtant, évaluer la capacité des poissons à répondre à l'acidification des océans est capital, non seulement parce que ces organismes représentent une composante majeure des écosystèmes marins, mais aussi parce qu'ils sont indispensables à la prospérité et à l'alimentation des populations humaines. Les expériences proposées visent à identifier et à comprendre les effets de l'acidification des océans sur la physiologie et le comportement des poissons.

Depuis le début de l'ère industrielle, l'utilisation croissante des énergies fossiles a conduit à une augmentation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère puis à l'absorption d'une partie de ce surplus de CO₂ par les océans. Ce CO₂ devenant un acide en réagissant avec l'eau, sa solubilisation a conduit à l'acidification progressive des eaux marines (baisse de son pH). Les organismes marins disposent de mécanismes physiologiques qui leur permettent de réguler leur pH interne lorsque le pH de l'eau change (ces mécanismes participent à ce que l'on appelle la régulation acide-base). Jusqu'à récemment, les mécanismes de la régulation acide-base des poissons étaient considérés comme si performants que ces animaux étaient perçus comme bien protégés contre les effets de l'acidification des océans. Un certain nombre d'études récentes ont cependant mis en lumière des effets possibles sur leur comportement et notamment sur la vigilance, la latéralisation (mise en place de l'asymétrie fonctionnelle différenciant les droitiers des gauchers), la capacité de détection des prédateurs et des proies, l'activité spontanée ou la socialisation. Ces résultats sont cependant encore très controversés, et bien que partiellement confirmés par nos propres études, ils doivent être précisés avant qu'une étude de leur base mécanistique (physiologique) puisse être entreprise.

Dans ce but, des bars européens (*Dicentrarchus labrax*) ont été mis en élevage depuis le stade oeuf à 2 niveaux de pression partielle de CO₂ (PCO₂; 400 et 1200 μ atm), correspondant à des valeurs de pH de 8.1 et 7.6. Ces conditions expérimentales ont été choisies sur la base des prévisions du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) pour 2100. Au début des expérimentations envisagées, ces animaux seront âgés de 2 ans.

Le projet envisagé comportera 3 procédures (marquage, respirométrie et test de nage).

- Procédure 1 : Marquage.

Il s'agit ici de marquer les 96 animaux (48 par traitement) avec des puces électroniques à usage vétérinaire. Ces puces seront insérées sous la peau des animaux avec un injecteur (seringue) à usage unique et elles permettront d'identifier les animaux préalablement à chaque manipulation (expérimentations, pesées...).

- Procédure 2 : Respirométrie.

Quarante huit individus (24 par traitement) seront soumis à un protocole visant à évaluer, à partir de la mesure de leur taux métabolique (consommation d'oxygène), leur niveau d'attention à leur environnement. Il s'agit ici d'utiliser le taux métabolique de repos des animaux comme indicateur du niveau de vigilance (attention, circonspection), vis à vis du milieu environnant. Ces mesures seront réalisées sur des animaux qui seront maintenus au calme durant plusieurs jours. Ces mesures seront réalisées à l'aide d'un ensemble de 4 chambres de respirométrie alimentées avec de l'eau thermorégulée, parfaitement aérée et dont la teneur en CO₂ sera contrôlée.

- Procédure 3 : Test de nage.

Quarante-huit individus (24 par traitement) seront soumis à un protocole visant à évaluer leur capacité à se positionner et à s'ajuster à un courant d'eau dont la vitesse sera progressivement augmentée. Dans ce but, les animaux seront placés individuellement dans un tunnel de nage qui, pour un poisson, correspond à ce qu'est un tapis de course pour un mammifère. Une caméra placée au dessus du tunnel de nage permettra d'enregistrer l'ensemble du test pour analyse ultérieure à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image. Des mesures de consommation d'oxygène (taux métabolique) durant la période de récupération post-test seront également effectuées.

Le nombre d'animaux impliqués dans cette étude correspond au strict minimum requis pour déterminer avec le plus de précision possible la loi de distribution des traits comportementaux ciblés et ainsi d'être mieux en mesure de différencier statistiquement les deux traitements. La littérature scientifique montre en effet que, quel que soit le trait étudié, les poissons sont caractérisés par une forte variabilité inter-individuelle (> 100%).

La procédure en 3 étapes envisagée sera conduite dans le respect de la règle des 3R c'est à dire :

- les procédures envisagées seront conduites en répondant aux exigences de Réduction (utilisation d'un nombre d'animaux correspondant au minimum requis pour s'assurer de la robustesse de nos analyses statistiques)

- les procédures envisagées seront conduites en répondant aux exigences de Raffinement (tout sera mis en œuvre pour limiter l'angoisse et la souffrance des animaux).

- L'économie du modèle animal ne pourra pas être faite (Remplacer) dans la mesure où les processus étudiés s'appliquent à l'organisme vivant, dans son intégrité et toute sa complexité.

17069 Détecter précocement les phases de décompensation de l'insuffisance cardiaque est un enjeu de santé publique majeur. Dans cette étude préclinique, 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 Médical (DM) miniaturisé. Il est capable de recueillir des grandeurs physiques caractérisant l'activité cardiorespiratoire, et de les transmettre à une station de recueil capable de les interpréter.

A terme, ce dispositif médical sera destiné 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 gastrotomie 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 DM 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 principaux objectifs de cette étude préclinique sur un modèle animal de grand mammifère (le porc, n=36) sont :

- Démontrer la faisabilité de la procédure opératoire de la pose du DM dans les mêmes conditions que chez l'Homme (anti-agrégation plaquettaire et anticoagulation)
- D'évaluer la pérennité *in vivo* du DM placé dans la paroi de l'estomac et la réponse à long terme de l'hôte à la présence de l'implant dans la sous-muqueuse de la paroi.
- La capacité du retrait du DM par voie endoscopique validant ainsi la réversibilité de cette intervention- Enfin, confirmer la possibilité de ré-implanter un dispositif au niveau de la sous-muqueuse gastrique chez des sujets ayant déjà bénéficié d'une implantation du dispositif.

Le protocole a été établi dans le respect de la règle des 3R. Réduire : Les objectifs de l'étude n'incluant pas d'approche statistique, le nombre d'animaux impliqués a pu être limité au maximum, sans que cela puisse compromettre la mise au point de la procédure chirurgicale et les conclusions du projet sur la stabilité de l'implant. Remplacer : 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. Raffiner : 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 (analgésiques en post-opératoire et médication spécifique pour limiter les éventuelles douleurs induite par la pose de l'implant).

17070 Les patients atteints de mucoviscidose développent des infections pulmonaires chroniques causées par des bactéries opportunistes, dont principalement *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Une fois développées, ces infections chroniques à PA sont incurables et les patients atteints sont traités à vie avec des antibiotiques pour diminuer le taux de bactéries dans les sécrétions et améliorer la fonction respiratoire. La tobramycine (TOB) et la colistine (COLI), administrées plusieurs fois par jour par inhalation, sont parmi les antibiotiques les plus couramment utilisés.

Dans ces infections, une des raisons qui limite l'efficacité des antibiotiques est la présence de PA sous forme de biofilms, constitués d'agrégats de bactéries enfermés dans une matrice polymérique anionique protectrice. Les biofilms et le mucus pulmonaire des patients forment une barrière qui limite la diffusion des antibiotiques cationiques, tels que la TOB et la COLI, jusqu'aux bactéries, diminuant ainsi leurs effets et augmentant le risque d'apparition de bactéries résistantes. Ainsi, en raison du nombre limité de nouveaux antibiotiques, le développement de stratégies alternatives pour l'administration des antibiotiques est nécessaire pour maintenir l'efficacité de ceux de dernier recours comme la COLI.

L'objectif du projet est de favoriser la diffusion de la TOB et COLI dans les biofilms de PA et le mucus des patients atteints de mucoviscidose en les incorporant dans des nanoparticules capables de diffuser dans ces milieux. Aussi, nous avons sélectionné plusieurs types de nanoparticules chargées en antibiotiques qui ont montré *in-vitro* une activité antibactérienne supérieure à celle de l'antibiotique libre. Maintenant, Il nous faut confirmer l'efficacité observée *in-vitro* sur des modèles animaux.

Les objectifs de ce projet sont donc multiples. D'abord, nous voulons réaliser des études pharmacocinétiques (le devenir des médicaments dans l'organisme) de la TOB et COLI chez le rat infecté, après l'administration de ces antibiotiques sous la forme de nanoparticules. Notre laboratoire à une expertise dans ce type de manipulation et a déjà réalisé ces expériences avec ces antibiotiques administrés sous forme de solution à des animaux sains. Ainsi, le nombre d'animaux requis sera réduit. Ensuite, nous voulons réaliser des études d'efficacité de ces antibiotiques administrés seuls en solution ou sous forme de nanoparticules chez le rat infecté, ceci afin d'identifier les meilleures nanoparticules potentiellement utilisables chez l'homme.

La règle des 3R avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. Le remplacement des animaux est impossible car aucun modèle *in-vitro* ne permet de prendre en compte l'ensemble des paramètres déterminant l'efficacité clinique et la tolérance d'un antibiotique. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum dans les groupes afin de détecter des différences statistiquement significatives entre les différents traitements testés. Notamment, les groupes contrôles seront partagés entre les différentes formulations d'un même

antibiotique. Tous ces aménagements contribuent à limiter le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet à 434 rats. Pendant l'expérimentation, le raffinement est pris en compte et les infections se feront sur des animaux anesthésiés et sous analgésiques. Après l'infection, les animaux vigiles sont placés dans un environnement thermostaté, avec un libre accès à la nourriture et à l'eau et une luminosité contrôlée avec une alternance veille/sommeil. Les conditions d'asepsie lors de l'administration de l'inoculum et des traitements seront préservées et les rats seront surveillés régulièrement (2 fois par jour) pendant toute la durée de l'expérimentation.

17071 Les maladies cardiovasculaires représentent une des principales causes de décès dans les pays industrialisés et la première cause chez les femmes entre 25 et 55 ans. Parmi ces maladies, l'insuffisance cardiaque est une conséquence très fréquente d'un rétrécissement de l'aorte. Ce rétrécissement, qui se forme soit par un dépôt de graisse dans l'artère (athérosclérose) ou un rétrécissement de la valve aortique par calcification, est responsable d'un obstacle à l'écoulement. Ceci va donc faire contracter le cœur contre un obstacle ce qui va avoir tendance à l'épuiser et donc faire qu'il se contracte de manière insuffisante. Cette insuffisance cardiaque s'aggrave très souvent vers un infarctus et donc nécessite une intervention chirurgicale au préalable. Sans cette intervention les patients décèdent mais cette opération délicate n'est pas sans conséquence et peut s'avérer parfois être la cause de complications post opératoire d'où l'importance de la recherche médicale pour trouver des solutions de protection du cœur. Il a été montré dans la littérature un rôle du récepteur aux acides biliaires FXR dans le fonctionnement cardiaque mais les études sont controversées avec tantôt un effet bénéfique de l'absence de FXR tantôt un effet délétère. En utilisant une méthode alternative à l'expérimentation animale, notre équipe a récemment montré un effet très intéressant de l'absence de FXR sur la taille des lésions cardiaques post infarctus, effet qui plus est différent entre mâle et femelle, justifiant la mise en œuvre d'un protocole de recherche spécifique sur un modèle proche de la physiopathologie humaine. Notre équipe a également développé ces dernières années des agonistes et des antagonistes du récepteur FXR. Si les résultats obtenus sur modèle caricatural d'infarctus avec une méthode alternative s'avéraient identique sur un modèle physiopathologique murin développant un phénotype identique à la symptomatologie humaine, la mise en œuvre d'un traitement visant à moduler le taux d'expression de FXR cardiaque pourrait être une nouvelle stratégie de cardioprotection efficace. Cependant, afin de pouvoir proposer une solution thérapeutique efficace et sans risque pour les patients, il est nécessaire de bien comprendre comment fonctionne ce récepteur FXR et voir si, sur des cœurs pathologiques, la modulation de son expression peut être efficace. Nous avons ainsi besoin de mettre en œuvre un modèle expérimental sur des souris mâle et femelle qui reproduit la pathologie humaine. Ce modèle permettra d'évaluer la potentielle protection du cœur en fonction de la présence (souris WT) ou absence (souris KO) de FXR mais cela a deux moments différents de la journée (matin et soir) puisque notre équipe a montré une influence circadienne majeure sur la fonction et la dysfonction cardiaque induite par la pathologie. Ceci sera en réalité réalisé en modulant le cycle lumière obscurité de la stabulation des souris. Si nous parvenons à montrer, au moyen de cette étude d'une durée de 4 ans, qu'effectivement sur des cœurs de souris la modulation de FXR protège le cœur des lésions du remodelage hypertrophique nous pourrions envisager le traitement par nos candidats médicaments qui permettent de moduler directement ou indirectement le taux d'expression de FXR et ainsi diminuer le taux de complications post opératoire et la mortalité associée à ces pathologies chez les patients. Pour cela, nous devons réaliser un acte chirurgical sur les souris pour réduire le diamètre de l'artère aorte comme cela se produit chez le patient. Les souris seront préalablement hébergées dans des armoires spécifiques permettant de régler le cycle lumière obscurité à façon et donc de pouvoir mettre les souris en décalage horaire (matin-soir) en modifiant le réglage des armoires. Les souris sont 4 par cages avec enrichissement, coton, maison, tunnel afin de limiter au maximum les conditions de stress et n'avoir que le décalage horaire à subir (RAFFINEMENT). Les conditions pathologiques humaines étant complexes, fruit du rétrécissement de l'aorte ou de la calcification de la valve, mais également dues au phénomène inflammatoire et à la souffrance cellulaire en elle-même, il n'est guère possible d'utiliser un modèle qui ne serait pas *in vivo*. Néanmoins, post chirurgie, nous utilisons une méthode de substitution pour évaluer la fonction cardiaque (REMPACEMENT). En effet l'utilisation de cœur isolé perfusé nous permet de ne pas infliger de contraintes et de stress répété aux souris (RAFFINEMENT-REMPACEMENT) et surtout de diminuer considérablement le nombre de souris utilisées puisque les

tests statistiques ainsi que l'expérience de l'équipe montrent que seulement 10 souris par groupe sont nécessaires pour avoir des résultats fiables et scientifiquement exploitables (REDUCTION). Cependant, afin d'étudier l'impact du taux d'expression de FXR en s'affranchissant du moment de la journée (matin et soir) nous avons besoin de plusieurs groupes ainsi que de souris mâle et femelle ce qui pour cette étude de 4 ans fait un total de 640 souris soit 16 souris par mois. Les souris sont stabulées dans des cages hyper enrichies et des armoires chauffées isolées phoniquement afin de ne pas être perturbées par les bruits extérieurs (RAFFINEMENT). Les souris sont anesthésiées sous isoflurane et leur température corporelle est maintenue. Immédiatement après la chirurgie et encore sous anesthésie, une injection d'analgésique est réalisée afin que la souris se réveille sans douleur (RAFFINEMENT). La souris opérée est placée seule dans une cage dans une armoire pendant 12 h afin de récupérer pleinement de l'anesthésie et de ne pas se faire grignoter la suture par ses congénères (REDUCTION). La souris est surveillée toute les heures pendant les 6 premières heures de réveil puis dès le lendemain matin. Si les critères d'arrêt ne sont pas observés (infection de la suture ou réouverture de la suture) la souris est remise dans sa cage d'origine avec ses congénères afin de reprendre une activité sociale (RAFFINEMENT). A l'issue de la période d'établissement de l'insuffisance cardiaque induite par le rétrécissement de l'aorte la méthode de substitution d'exploration de la fonction cardiaque est mise en œuvre et l'ensemble des autres organes (foie, intestin, cerveau, muscle, graisse et peau) est collecté pour la banque de tissu du laboratoire (REDUCTION).

17072 Les synucléinopathies est le terme regroupant différentes maladies neurodégénératives humaines dont la maladie de Parkinson (MP) et l'atrophie multisystématisée (AMS). La caractéristique commune de ces pathologies neurodégénératives est une accumulation anormale de la protéine α -synucléine sous une forme aberrante dans les cellules du système nerveux central. L'accumulation de l' α -synucléine est impliquée dans la mort des neurones qui est observée dans certaines régions particulières du cerveau chez les patients atteints de ces maladies.

Parmi ces maladies, la MP, la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente, présente une accumulation pathologique d' α -synucléine dans les neurones. L'AMS, une maladie plus rare mais à progression plus rapide, présente une accumulation d' α -synucléine pathologique majoritairement dans les oligodendrocytes, autres cellules du système nerveux central. Ces maladies neurodégénératives ne possèdent à ce jour aucun traitement curatif. Les symptômes sont caractérisés par des problèmes locomoteurs très lourds mais également non-moteurs. Développer des outils thérapeutiques de manière à enrayer le développement de ces maladies chez les patients est un enjeu de santé publique majeur aujourd'hui. Les preuves croissantes du rôle de l' α -synucléine dans ces pathologies ont conduit à chercher des pistes thérapeutiques pour réduire la toxicité de l' α -synucléine.

Avec cet objectif de trouver de nouvelles voies thérapeutiques, nous nous sommes concentrés sur les lysosomes. En effet, les lysosomes sont des compartiments au sein des cellules dont la fonction principale est de nettoyer les cellules en dégradant les molécules, notamment la protéine α -synucléine pathogénique accumulée, ainsi que les déchets cellulaires indésirables. Lorsque leur fonction est perturbée, les déchets s'accumulent dans les cellules nerveuses, ce qui entraîne la mort de la cellule et crée des lésions nerveuses. Depuis ces dernières années, de nombreuses preuves suggèrent qu'un dysfonctionnement des lysosomes à l'intérieur des cellules nerveuses peut contribuer à l'accumulation de l' α -synucléine et donc à terme à la mort des neurones comme observée dans les cas de la MP et de l'AMS.

Des stratégies qui visent à augmenter ou restaurer les fonctions de dégradation via les lysosomes semblent donc des thérapies prometteuses pour ces maladies. En adéquation avec cette hypothèse de travail, différents composés à intérêt thérapeutique ont démontré d'une efficacité à augmenter le système de dégradation cellulaire lysosomale dans des modèles cellulaires et/ou des modèles animaux.

Ce nouveau projet préclinique a pour but de répondre à la question d'un effet neuroprotecteur dans différents modèles animaux de synucléinopathie après traitement avec six différents composés par différentes voies d'administration (orale, sous-cutanée, intranasale ou intracrânienne).

L'objectif est de tester si un traitement avec ces six composés d'intérêt différents induit une augmentation de la fonction lysosomale amenant une plus importante dégradation de l' α -synucléine

pathologique et donc des effets neuroprotecteurs dans différents modèles animaux de la MP et de l'AMS.

L'impact bénéfique potentielle sur l'accumulation d'alpha-synucléine et donc sur le fonctionnement cérébral et la survie neuronale ne peuvent être évalué que chez l'animal.

Dans le respect du R de réduire, des études pilotes seront effectuées pour chaque molécule afin de confirmer l'activation des lysosomes par ces molécules d'intérêt et l'absence de toxicité chez les animaux. Une fois l'étude pilote pleinement validée, chaque molécule d'intérêt sera testée lors d'une seconde étude pour évaluer l'effet neuroprotecteur potentiel sur les différents modèles de synucléinopathie et leurs pendant contrôles. En parallèle une troisième étude dite « delayed start » sera menée avec l'administration de chaque composé plus tardivement dans le protocole. Au total pour les deux études (pilote et validée), et afin de tester les 6 composés dans trois modèles animaux différents et via différentes voies d'administration, cela représente 3764 animaux dont 2916 souris et 848 rats pour une durée de 5 ans. Ce nombre a été établi pour obtenir une puissance statistique suffisante lors de l'étude afin de démontrer un réel effet neuroprotecteur induit par chaque molécule d'intérêt dans les modèles rongeurs. Nous utiliserons une proportion égale de mâles et femelles.

Dans le respect du R de remplacer, dans l'état actuel des connaissances, nous ne pouvons nous passer d'animaux vivants, car il n'est pas possible de miner le développement spatiotemporel de ces maladies dans des modèles *in vitro*.

Dans 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 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'analgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures pour 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 après chaque procédure, et accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. 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.

17073 Malgré la remarquable évolution de la médecine ces dernières décennies en termes de méthodes de diagnostic et de nouvelles thérapies, le cancer reste une des causes majeures de décès au niveau mondial avec une contribution importante due à la présence de métastases.

L'identification du caractère métastatique d'une tumeur, aide à définir une meilleure orientation des stratégies de traitement du cancer, permettant ainsi des traitements plus efficaces et rentables sur le plan clinique, améliorant les résultats pour les patients et réduisant la charge économique du traitement du cancer.

L'obstacle principal des techniques d'imagerie médicale disponibles actuellement est lié à leurs limites de détection précoce de tumeurs, ainsi que l'incapacité de détection de lésions métastatiques ou encore la difficulté du suivi thérapeutique (la réduction de taille des tumeurs n'est souvent détectable qu'après plusieurs cycles de chimiothérapie). Par ailleurs, les agents de contraste utilisés en clinique à ce jour ne sont pas spécifiques. L'identification et la validation de biomarqueurs d'imagerie moléculaire adéquats restent un vrai besoin clinique.

Des protéines en surexpression à la surface des cellules tumorales constituent des bons biomarqueurs. La protéine netrin-1 est produite par des cellules tumorales en quantités plus élevées dans 60% des cancers mammaires métastatiques, 47% des tumeurs de poumon, 38% des neuroblastomes et une large fraction de tumeurs pancréatiques. L'implication de cette protéine dans les processus de migration cellulaire menant aux métastases a été mise en évidence par sa surexpression dans les cancers métastatiques mammaires humains. Elle n'est pas sur exprimée dans des tumeurs homologues non-métastatiques.

Le projet a pour objectif la conception et la validation de nouveaux agents de contraste (sondes) qui ciblent spécifiquement la netrin-1, pour le diagnostic précoce du cancer mammaire de type métastatique.

Plusieurs molécules ont été synthétisées, caractérisées et évaluées *in vitro* et certaines de ces molécules présentent des résultats satisfaisants. L'objectif de cette demande est d'évaluer les molécules sélectionnées, sur des souris porteuses de tumeurs mammaires métastatiques 4T1 qui surexpriment la protéine d'intérêt (netrin-1).

Des tumeurs mammaires métastatiques seront donc induites chez la souris, par injection de cellules de type 4T1 pour l'ensemble du projet.

Les souris seront ensuite utilisées dans 2 procédures successives :

-Une validation de la biodistribution des sondes développées, par imagerie scintigraphique ou TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique). Des lots de 6 souris par sondes seront nécessaires pour cette procédure. L'imagerie pourra être réalisée jusqu'à 72 h post administration intraveineuse des sondes.

-Une étude de biodistribution *ex-vivo* pour la ou les nouvelle(s) sonde(s) ayant montrées un profil de biodistribution intéressant lors de la procédure 1. Cette procédure sera mise en oeuvre sur un maximum de 6 souris par sonde. En pratique, une sonde sera administrée par voie intraveineuse, puis après un temps de biodistribution défini grâce à la procédure 1, les souris seront mises à mort afin de prélever des organes d'intérêts dans lesquels la quantité précise de sonde présente sera mesurée.

Le temps entre l'induction des tumeurs et l'administration des sondes sera compris entre 7 et 21 jours de manière à avoir des tumeurs bien constituées mais de petite taille car nous recherchons des biomarqueurs pour la détection tumorale précoce. Les procédures de biodistribution *in vivo* et *ex vivo* dureront ensuite au maximum 72h.

Nous prévoyons d'étudier 6 sondes. Pour chaque sonde nous utiliserons un maximum de 6 souris, soit 36 souris par procédure et donc un total de 72 animaux maximum au cours du projet.

Pour les souris porteuses de tumeurs mammaires, les dommages attendus sont liés aux développements d'une tumeur et nous mettrons en place un suivi ainsi que des points limites pertinents permettant d'anticiper toute douleur ou stress qui pourrait être provoqué chez l'animal. Concernant la douleur infligée par l'injection des cellules et réactifs pour l'imagerie, elle correspond à celle d'une piqûre d'aiguille. Les examens d'imagerie seront réalisés sous anesthésie gazeuse et les prélèvements réalisés post mortem.

Le projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale:

Remplacement: le modèle animal souris est fondamental dans notre cas, puisque l'étude préclinique en particulier ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement: les animaux seront observés scrupuleusement et des points limites prédictifs nous permettront de prendre les mesures nécessaires afin d'éviter toute souffrance au cours de l'expérimentation. De plus, durant les examens d'imagerie et l'induction du modèle tumoral, les souris seront anesthésiées. Enfin, les souris seront hébergées dans des cages en portoir ventilé enrichies avec du Celuron. Elles auront un accès à l'eau et la nourriture *ad libitum* et un cycle jour/nuit 12h/12h pendant toute la durée de l'expérimentation.

Réduction: le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles.

17074 En médecine vétérinaire, le surpoids est un problème très fréquemment rencontré chez le chat. Il est toujours la résultante d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques, il altère la qualité de vie de l'animal et est à l'origine de nombreuses complications. Les désordres métaboliques et le diabète sucré sont reconnus depuis plusieurs années comme des complications majeures. La prise en charge médicale du diabète comprend des contraintes médicale et économique et incitent à repenser la stratégie thérapeutique de l'animal diabétique ou faire émerger une nouvelle approche de gestion du surpoids afin de réduire le risque d'apparition du diabète et ainsi limiter et/ou prévenir les complications qui lui sont associées. La gestion du surpoids fait souvent appel à une approche

multidisciplinaire, dans laquelle, le recours à des interventions nutritionnelles est considéré comme une option intéressante en complément des programmes de restriction calorique. Leur usage vise généralement trois modes d'action que sont le contrôle de l'appétit, l'inhibition de l'absorption/accumulation de l'énergie ainsi que la stimulation de sa dépense. Cependant, il existe très peu ou pas de travaux à ce jour, évaluant une stratégie nutritionnelle visant simultanément ces trois catégories de mécanismes avec contrôle de l'inflammation, en contexte de prévention du diabète sucré chez les animaux obèses en médecine vétérinaire. Avant de mener des travaux chez le chat, la première étape de ce projet vise à explorer, dans deux modèles expérimentaux chez le rat (modèle spontané de rat Zucker, modèle de syndrome métabolique induit chez le rat Sprague Dawley), l'action préventive d'un mélange nutritionnel à tropisme métabolique et inflammatoire, à base de trois nutriments sur l'apparition de l'insulino-résistance et du diabète sucré. Ce traitement sera administré pendant une durée de 3 mois. Les ingrédients nutritionnels choisis devraient exercer un effet synergique grâce à la complémentarité de leur mode d'action.

Les protocoles de l'étude incluent des méthodes non-invasives *in vivo* telles que la pléthysmographie caudale, pour la mesure de la pression artérielle. La mesure des paramètres de marche sera également effectuée de manière non invasive grâce au système Catwalk. Ils comportent également des méthodes mini-invasives sur l'animal vigile : le test de tolérance au glucose et l'exploration *ex vivo* par la technique d'organes isolés. L'étude est complétée par des analyses biochimiques pour caractériser d'éventuels effets sur le système cardiovasculaire et les changements métaboliques. L'importance du microbiote dans les maladies métaboliques étant de plus en plus soulignée, une exploration approfondie de l'effet du traitement sur la flore intestinale par analyse des fèces sera réalisée au cours du projet. L'ensemble de ces approches ayant pour but d'avoir une approche autant intégrative que possible et de recueillir un maximum de données pour chacun individu. Limitant ainsi le nombre d'animaux utilisés et permettant une approche scientifique éthique et de qualité.

Ce projet sera réalisé chez 64 rats dans le respect de la règle des 3R.

Réduction : De manière à respecter la règle de réduction, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum permettant d'anticiper les différences interindividuelles. Le nombre de 8 rats est nécessaire et suffisant pour réaliser une analyse descriptive. Ce nombre est basé sur notre expérience précédente de mise en œuvre de protocoles de pharmacologie expérimentale lors desquels nous avons obtenus des résultats reproductibles et exploitables.

Raffinement : - Un hébergement qui respecte les recommandations en vigueur, une animalerie contrôlée (température, hygrométrie) et un enrichissement des cages (mise à disposition de carrés de coton, des tunnels, des morceaux de bois, du Sizzle dry Kraft pour occuper chaque individu dans la cage).

- Un suivi régulier des animaux par le personnel animalier (observation quotidienne de l'état général et du comportement, pesées hebdomadaires)
- Définition de points limites et une grille de scoring de la souffrance et/ou de la douleur chez tous les animaux soumis aux différents traitements prévus dans le projet.
- Optimisation des protocoles expérimentaux pour chaque procédure afin d'obtenir le maximum d'informations et ainsi une meilleure analyse des résultats obtenus.

Remplacement : Le remplacement des animaux n'est pas possible pour répondre aux questions du présent projet en raison de l'absence de méthodes alternatives (*in-silico* et *in-vitro*.) pour explorer l'effet d'un traitement nutritionnel *in vivo*.

Les tests statistiques seront encadrés par la bio-statisticienne de l'équipe. Sur les artères isolées, à titre d'exemple, un modèle non-linéaire à effets mixtes (NLME) sera utilisé à l'aide du logiciel R pour la comparaison des courbes dose-réponse obtenues dans différentes conditions expérimentales dans les différents sous-groupes étudiés dans ce projet.

17075 Intitulé du projet : Imagerie exploratrice *in vivo* : mise en place, validation, optimisation de protocoles et caractérisation de nouveaux radiotraceurs et produits de contrastes chez le rongeur sain.

Durée du projet : 60 mois

Mots clés : imagerie, validation, caractérisation, *in vivo*

Ce projet de recherche fondamentale, de classe légère, a pour objectif d'optimiser et d'améliorer les protocoles d'imagerie IRM, TDM et TEP mis en place sur notre plateforme d'imagerie *in vivo* du rongeur de laboratoire.

L'imagerie biomédicale est l'une des disciplines les plus actives dans le domaine de la recherche médicale. Elle ne cesse d'évoluer, de se perfectionner et de proposer des technologies de plus en plus précises, performantes et novatrices.

L'Imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de visualiser les organes et tissus mous avec une grande résolution. Elle permet aussi de réaliser de l'imagerie fonctionnelle.

La tomodynamométrie (TDM) permet de visualiser avec une grande résolution spatiale les structures osseuses mais aussi les organes via l'utilisation de produits de contrastes radio-opaques.

La tomographie par émission de positons (TEP) est basée sur l'utilisation d'un traceur marqué par un atome radioactif qui permet d'étudier le fonctionnement normal ou pathologique d'un organe, le cerveau par exemple.

Ces trois modalités d'imagerie sont développées à la fois pour l'homme et le rongeur de laboratoire ce qui permet une recherche translationnelle de l'animal à l'homme.

Afin d'optimiser et d'améliorer ces outils, notre plateforme a besoin d'initier des protocoles de recherche méthodologiques en imagerie *in vivo*.

Finalité du projet : En IRM, l'objectif est de mettre au point, d'optimiser et développer de nouveaux protocoles et de réaliser des imageries anatomiques permettant de sélectionner les animaux en amont de leur inclusion dans des études.

Pour l'imagerie TDM l'objectif est de déterminer les paramètres d'acquisition à utiliser en fonction des spécifications des études.

En TEP l'objectif est la caractérisation de nouveaux radiotraceurs.

Objectif du projet : mettre à disposition des utilisateurs de la plateforme des protocoles d'imagerie optimisés spécifiquement pour répondre à leur question scientifique.

Nuisances prévues : Au cours des 5 ans de ce projet, un maximum de 100 rats et 100 souris seront utilisés. Toutes ces explorations méthodologiques seront réalisées sur des animaux sains, avec un degré de sévérité des procédures léger, les imageries étant réalisées sous anesthésie générale. Nous ne prévoyons pas de nuisances sur ces animaux, la pose éventuelle d'un cathéter veineux étant le seul acte invasif. C'est pourquoi, à l'issue du protocole les animaux seront maintenus en vie à la fin de la procédure et seront proposés au reclassement interne de notre animalerie, pouvant être utilisés dans des procédures d'autres projets de sévérité légère.

Application de la règle des 3R :

Remplacement : Le recours à l'animal est limité au maximum grâce à l'utilisation d'objets tests (fantômes) pour les mises au point de séquences IRM et l'utilisation de tests *in vitro* pour la sélection des radiotraceurs et produits de contrastes. Le recours à l'animal entier reste cependant indispensable car le mouvement lié à la respiration peut avoir un impact fort sur la qualité des images obtenues.

Réduction : Les effectifs représentent un maximum. En effet, les mises au point étant réalisées séquentiellement la procédure sera arrêtée dès que l'objectif sera atteint.

Raffinement : Les animaux seront hébergés par deux au minimum et ils auront une phase d'acclimatation d'au moins une semaine avant d'être inclus dans une procédure. Ils seront maintenus sous anesthésie gazeuse pendant toute la durée des examens et le seul acte contraignant sera la pose éventuelle d'un cathéter veineux. La température et la respiration des animaux seront surveillées en permanence par un système de monitoring afin d'être le plus précis sur les doses d'anesthésique utilisés. Après la session d'imagerie, les animaux seront placés sous une lampe chauffante pendant leur phase de réveil avant de retourner dans leur pièce de stabulation.

Chaque examen aura une durée maximale d'1h30 et nous prévoyons un temps de repos minimal de 72h entre deux imageries.

L'optimisation des différents protocoles d'imageries sera mise à disposition des utilisateurs de la plateforme ce qui permettra d'améliorer la qualité des résultats obtenus et de diminuer la quantité d'animaux nécessaires à la réalisation d'un projet.

17076 L'hypertension, ou tension artérielle élevée, est une maladie dans laquelle les vaisseaux sanguins subissent en permanence une pression élevée, ce qui peut les endommager. Plus la pression artérielle est forte, plus le risque est élevé d'endommager le cœur et les vaisseaux sanguins au niveau des organes essentiels comme le cerveau et les reins. L'hypertension est la première cause évitable de maladie cardiovasculaire et d'AVC dans le monde. Si elle n'est pas contrôlée, l'hypertension peut entraîner une crise cardiaque et un grossissement du cœur, aboutissant à une insuffisance cardiaque, ainsi que des anévrismes. La pression dans les vaisseaux sanguins peut provoquer une hémorragie cérébrale et un accident vasculaire cérébral. Dans le monde, plus d'1 adulte sur 3 souffre d'hypertension artérielle, un état pathologique à l'origine de la moitié environ des décès dus aux accidents vasculaires cérébraux et aux cardiopathies et responsable d'environ 9,4 millions de morts chaque année. Lorsqu'elle nécessite un traitement pharmacologique, une prise rigoureuse de ce dernier par le patient atteint d'hypertension s'avère importante pour assurer la qualité du traitement. Par ailleurs, en début de prise une adaptation progressive de la posologie s'avère nécessaire afin d'éviter d'exposer les patients à des phénomènes d'hypotension.

L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un industriel pharmaceutique qui développe des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles cardio-vasculaires. Cet industriel a notamment développé une nouvelle forme de galénique (matrice sous-cutanée) permettant une libération lente et prolongée de médicaments. Le médicament Y est un anti-hypertenseur de première intention ayant reçu une autorisation de mise sur le marché et dont l'efficacité a largement été documentée.

En théorie, la galénique de notre client devrait largement améliorer la biodisponibilité du médicament Z sur le long terme tout en diminuant l'amplitude de ses effets secondaires en évitant les effets de pics plasmatiques. Elle aurait ainsi l'avantage de permettre une réduction drastique des prises pour le patient (une administration par mois) améliorant ainsi largement son confort de vie. La matrice à libération prolongée de notre client a été testée *in silico* et *in vitro* et sa bonne tolérance locale au niveau sous-cutané a également été démontrée. Au total, 6 formulations à libération prolongée différentes du médicament Y ont été développées et l'objectif du présent projet vise ainsi à déterminer leur profils pharmacocinétiques *in vivo*, suite à une administration unique par voie sous-cutanée chez le rat.

Ces profils seront comparés à ceux obtenus lors d'administrations uniques du médicament Y selon sa posologie classique (une administration sous-cutanée).

Les procédures du présent projet se limiteront ainsi à l'administration des formulations à libération prolongée du médicament Y et du médicament Y classique, suivie de prélèvements sanguins répétés pour dosages des composés et détermination des profils pharmacocinétiques. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mieux sécuriser le développement de leurs composés en permettant une sélection et une classification de ses leads sur des critères pharmacocinétiques. Pour cette étude, un total de 63 rats Wistar mâles sera nécessaires, séparés en 7 groupes expérimentaux de 9 animaux. La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études pharmacocinétiques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Notamment, les volumes des prélèvements sanguins en série seront limités au strict nécessaire pour l'élaboration des dosages. Les prélèvements s'avérant relativement fréquents le premier jour de l'étude, l'effectif a été doublé afin de ne réaliser que la moitié des prélèvements sur un même animal pour cette journée. Par ailleurs, les prélèvements seront réalisés par ponction de la veine de la queue à l'aide de microperfuseurs à ailettes, ces derniers autorisant un prélèvement sanguin en n'insérant que le premier millimètre de l'aiguille dans la veine. Les animaux seront hébergés à 4/5 par cage et un enrichissement du milieu de vie sera assuré par l'ajout de petites briquettes en bois et de tubes cartons spécifiques pour rat (SAFE). Enfin, bien que le

protocole soit relativement peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis (administration d'analgésiques).

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure d'obtenir des données significatives sur les paramètres pharmacocinétiques 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 des paramètres pharmacocinétiques.

17077 Depuis le début des années 1980, le développement des biotechnologies a permis la construction génétique de bactéries qui peuvent ainsi exprimer différents gènes. Parmi ces bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* semble représenter un bon candidat, de par ses propriétés métaboliques bien connues et son génome de grande taille qui reste un des mieux annotés du monde microbien. Cette dernière caractéristique représente un avantage considérable pour la modification génétique et l'optimisation de cette souche comme plateforme biologique pour la production de protéines recombinantes.

En raison de son appartenance au niveau 2 de sécurité microbiologique, ce microorganisme ne peut donc pas être utilisé à des fins biotechnologiques comme tel, ou limite son utilisation aux laboratoires équipés en conséquence.

Afin de rendre cette bactérie inoffensive, une société s'est lancée dans la construction d'une souche atténuée nommée SM54 (« bactérie verte »), dérivée de la souche de référence de *P. aeruginosa* PAO1, afin de la proposer sur le marché de la bio-production. Ainsi, les principaux gènes de virulence ont été supprimés du génome de PAO1 par des techniques de biologie moléculaire. De la même manière, l'essentiel des gènes pouvant conférer de la résistance aux antibiotiques a été éliminé. Toutes ces délétions ont rendu la souche « verte » hypersensible aux antibiotiques utilisés en clinique et 82 % moins cytotoxique.

Des premiers tests de virulence *in vivo* sur le modèle *Galleria mellonella* ont été effectués et ont montré une diminution de 50 % de la pathogénicité du mutant SM54 par rapport à PAO1, après 24 h d'infection. Ce modèle de larve est un bon indicateur de la virulence, mais il ne possède cependant qu'une immunité innée. Pour se rapprocher au mieux de la réaction immunitaire observée chez l'Homme (immunité innée et adaptative), les tests de virulence sur le modèle murin sont envisagés afin d'étudier l'impact du mutant SM54 sur le système immunitaire, en comparaison avec la souche parentale PAO1. Pour cela, les deux souches seront testées dans un modèle de sepsis et 60 souris CD1 seront nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

Il se découpera en deux phases :

- Phase pilote permettant de définir la DL100 de la souche parentale PAO1, permettant d'obtenir 100 % de mortalité sur 48h.

- La deuxième phase permettant de comparer la souche mutante SM54 à la souche parentale PAO1 avec l'inoculum défini dans la phase pilote.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect à la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaires pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 8 par groupe (au lieu de 10 dans la première phase de l'expérimentation) grâce à l'expérience acquise lors des études précédentes. Des analyses *in vitro* et même *in vivo*, sur une larve ont déjà été réalisées, toutefois ces études ne permettent pas de conclure sur la pathogénicité du mutant SM54 ne pouvant être que caractérisé sur des modèles pré-cliniques murins (possédant un système immunitaire très proche de celui de l'Homme) ; 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).

17078 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe notamment des actifs ayant un intérêt thérapeutique dans le domaine de l'inflammation chronique de l'intestin. Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets

d'un traitement chronique par 4 composés (la dénomination des composés est sujette à confidentialité) sur l'inflammation colique chez la souris. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de détailler l'efficacité et les mécanismes d'action de leurs composés.

Le modèle d'inflammation colique qui sera utilisé est un modèle d'inflammation induite par adjonction de Dextran Sodium Sulfate (DSS) dans l'eau de boisson pendant 5 jours. Les composés à tester seront administrés pendant 23 jours: 15 jours avant la première administration du DSS et 8 jours après. Le poids corporel, la prise alimentaire et la prise de boisson des animaux seront mesurés tous les jours pendant toute la phase de traitement. Les 8 derniers jours de traitement, un prélèvement de fèces quotidien sera réalisé (pour analyse de biomarqueurs). A l'issue du traitement, les animaux seront euthanasiés et le côlon sera ainsi prélevé, mesuré et pesés. Une analyse histologique macroscopique sera réalisée sur une portion du côlon par deux expérimentateurs afin de quantifier les zones d'épaississement, d'hyperhémie et d'ulcération de la muqueuse. Une seconde portion de côlon sera prélevée et immédiatement congelée pour une analyse d'expression de biomarqueurs d'intérêt. Une troisième et dernière portion sera réservée pour analyse histologique sur coupes pour l'établissement d'un score de sévérité sur des critères microscopiques.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal utilisé est un modèle d'inflammation colique induite par administration de DSS chez la souris qui est un modèle particulièrement bien caractérisé dans la littérature (Chassaing et al, 2014, Dextran-Sulfate

Sodium (DSS)-induced colitis in Mice, Curr Protoc Immunol, 104 : Unit15.25). Le protocole sera planifié de façon à limiter au maximum tout stress induit aux animaux (périodes d'acclimatation et d'habituation des animaux aux procédures d'administration) et à établir des points limites appropriés. Les animaux seront hébergés individuellement (du fait des mesures de prise alimentaire et des récoltes de matière fécale imposées par le protocole) et un enrichissement de leur environnement sera mis en place sous forme de brique de bois spéciales pour rongeurs et de dômes en cartons.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de résultats préliminaires obtenus lors d'études antérieures menées par le client. Le nombre de 10 animaux par groupe a été défini comme le nombre minimum d'animaux à utiliser pour pouvoir mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés. Un total de 240 souris Balb/cJ sera utilisé, divisé en 24 groupes de 10 animaux. Ainsi, pour chacun des 4 composés à tester, un groupe contrôle du modèle (non traité au DSS), un groupe contrôle du traitement (traité au véhicule), un groupe contrôle positif (traité avec un composé de référence) et 3 groupes traités avec un des composés à tester sous 3 doses (soit 6 groupes/composé).

- 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 l'inflammation colique.

17079 La pandémie mondiale actuelle liée au SARS-Cov2 (COVID-19) rend urgent le développement d'un vaccin efficace afin de pouvoir sortir des restrictions sanitaires mises en place jusqu'ici pour protéger les populations. De plus, cette pandémie nous rappelle que nous pourrions être confrontés dans le futur à d'autres agents infectieux.

C'est pourquoi nous avons développé une stratégie vaccinale originale et modulable afin de répondre rapidement aux besoins actuels face au SARS-Cov2, et qui pourra aussi être facilement modifiée pour créer un nouveau vaccin à l'encontre d'un autre virus qui causerait une pandémie future. Ainsi nous utilisons simplement une « coque de virus vide » (donc totalement sécurisée et non infectieuse) à laquelle nous pouvons accrocher des morceaux d'un virus d'intérêt (antigènes). Une fois le vaccin administré, ce sont ces antigènes qui seront reconnus par notre système immunitaire, qui développera une réponse anticorps efficace (immunisation) protégeant du vrai virus pathogène, car il porte les mêmes antigènes que ceux contenus dans le vaccin.

Ainsi, le but de ce projet est de tester l'efficacité de notre stratégie vaccinale dans l'immunisation d'animaux, c'est-à-dire la capacité de notre vaccin à induire une réponse anticorps forte. Pour cela nous devons tester différentes formules de vaccins (6 formulations au total), contenant différents

morceaux du SARS-Cov2 (différents antigènes) afin de déterminer quel antigène est le plus efficace pour déclencher cette réponse anticorps. Nous devons également tester plusieurs voies d'injection (sous cutanée, intramusculaire) afin de déterminer par quelle voie l'immunisation est la plus efficace.

Ce projet nécessite 160 souris au total, pour tester les 6 formulations vaccinales ainsi que les 2 voies d'injection. Ce projet suit la règle des 3 Rs. En effet, tous les tests *in vitro* préalables ont été réalisés, nous ne pouvons donc pas REMPLACER notre modèle car nous avons maintenant besoin de valider notre concept *in vivo*. De plus nous REDUISONS au minimum le nombre d'animaux pour pouvoir conclure. Au niveau du RAFFINEMENT, les animaux évolueront dans des environnements enrichis, et seront anesthésiés lors des prélèvements sanguins nécessaires aux tests sérologiques d'immunisation. Le bien-être des animaux après vaccination sera également suivi de façon rapprochée.

17080 Les odeurs jouent un rôle majeur dans le comportement social et alimentaire du jeune mammifère dès la naissance, voire dès avant celle-ci. La connaissance de leur nature et de leur mode d'action est essentielle pour comprendre la perception que le nouveau-né et le jeune en développement ont de leur environnement olfactif, et l'utilisation qu'ils en font pour survivre et grandir (interaction avec la mère pour téter/être protégés, apprentissage d'informations nouvelles, préparation à la vie autonome), par exemple chez les espèces d'élevages. Cette connaissance est bénéfique à l'Homme (optimisation du bien-être de l'enfant, né à terme ou prématuré).

D'une durée de 5 ans, le projet que nous portons ici, à visée fondamentale (nouvelles connaissances apportées en olfaction néonatale, mémoire néonatale, adaptation du nouveau-né à son environnement) et application potentielle à l'élevage pour optimiser la survie des jeunes, concerne une espèce très intéressante sur le plan olfactif, le lapin. Le lapereau répond en effet dès la naissance à des odeurs émises par la mère qui l'aident à s'orienter vers elle, à localiser très vite les tétines et à téter. Il répond notamment à une phéromone émise par toute lapine dans son lait: la phéromone mammaire (PM, 2-méthyl-2-buténal). La PM est un outil exceptionnel pour la recherche (seule phéromone connue à ce jour pour contribuer à la relation mère-jeunes chez les mammifères) car elle déclenche de façon immédiate et spontanée (sans apprentissage préalable) le comportement de recherche-prise en bouche des tétines, clairement observable et quantifiable, du lapereau. En nature, elle n'est jamais perçue seule, mais parmi d'autres odorants présents avec elle dans le lait/sur le corps de la lapine, donc dans des contextes de mélanges de plusieurs odorants. De façon spectaculaire, elle permet aussi au nouveau-né d'apprendre très rapidement (après une seule et très brève association) de nouvelles odeurs. Alors que nous étudions la PM et le modèle lapin sous différents angles depuis plus de 20 ans (interaction mère-jeunes, identification de signaux olfactifs, modulation des actions de la PM selon l'état prandial et l'âge du jeune animal, traitement cérébral, apprentissage d'odorants simples ou de mélanges, conséquences de ces apprentissages sur les préférences sociales et alimentaires...), l'objectif ici est de poursuivre certaines de nos recherches, via 5 procédures complémentaires, 1), 3) et 5) classées légères et 2) et 4) classées sans réveil. Ceci afin de mieux connaître les mécanismes de perception et de mémoire qui sous-tendent les comportements guidés par les odeurs chez le nouveau-né.

Pour cela, notre positionnement se situe à trois niveaux de traitement: la respiration et le flairage associé, qui permettent d'échantillonner les odeurs, la cavité nasale (muqueuse olfactive) site d'entrée et de début de leur traitement, et le comportement exprimé ou non suite à la perception des odeurs permise par les deux niveaux précédents. Nous comparerons ces processus entre des animaux naïfs et des animaux ayant appris une odeur grâce à la PM, et étudierons si ces processus changent au cours des premiers jours de vie postnatale.

Le comportement sera évalué en termes d'expression de mouvements précis (de tête et de bouche impliqués dans la localisation des tétines/la tétée). La respiration sera mesurée de façon non invasive dans une cage dévouée dans laquelle l'animal se déplace sans contrainte. Enfin, l'enregistrement de réponses électrophysiologiques au niveau de la muqueuse olfactive (conduit auprès d'un sous-échantillon d'animaux) impliquera une procédure nécessitant le prélèvement post-mortem de cette muqueuse.

Le projet respecte la règle des 3R en n'utilisant une majorité de procédures déjà mises au point et validées dans la littérature, adaptées aux questions scientifiques posées, en réduisant

systématiquement au minimum les effectifs en animaux par groupes de façon compatible avec l'analyse statistique et l'interprétation fiable des résultats, et en veillant au raffinement via l'hébergement des mères et des nouveau-nés dans des cages adaptées ainsi qu'en limitant la durée des procédures expérimentales (temps de passation des animaux) de même que les risques de stress et la douleur. Nos procédures impliqueront 174 lapereaux par an provenant de 35 portées, soit environ 870 animaux sur l'ensemble des 5 années (sont aussi évoqués dans ce projet 1300 lapereaux supplémentaires concernés par des essais purement comportementaux liés à la thématique de recherche incluant la Procédure 5, pour un total cumulé de 2170 lapereaux).

Notons que, comme la lapine ne vient de façon naturelle au contact de sa portée qu'une seule et brève fois par jour (5 min) pour allaiter (comportement conservé par la femelle domestique), la manipulation des jeunes en dehors de l'allaitement n'engendre pas chez cette espèce de stress lié à la séparation d'avec la mère. Par ailleurs, les présents travaux ne conduiront jamais à retirer une portée entière à une lapine, donc n'engendreront chez elle pas de stress lié à l'absence soudaine des jeunes et à l'arrêt de la lactation.

17081 Un sens de l'odorat fonctionnel est essentiel pour évaluer et apprécier les aliments, recevoir des informations sur les congénères détecter les menaces à l'aide de molécules odorantes transportées par l'air. Ainsi, un odorat défaillant est associé à une dégradation de la qualité de vie liée à une incidence plus élevée de troubles psychiques tels que la dépression et le sentiment d'insécurité sociale. Par ailleurs, il existe une population croissante de personnes âgées dont l'odorat est altéré par le vieillissement ainsi que par des traitements médicamenteux. Enfin, la perte d'odorat est un symptôme précoce des maladies dégénératives (Alzheimer, Parkinson) et des infections virales (COVID-19).

Notre projet a pour objectif d'étudier des enzymes (protéines) présentes dans les tissus olfactifs de la cavité nasale dont le double rôle est (i) d'éliminer les molécules odorantes après qu'elles aient été détectées afin d'éviter de saturer le système olfactif et (ii) de produire, à partir des molécules odorantes de nouvelles molécules odorantes pouvant également être détectées et donc intervenir dans la perception olfactive. Ce mécanisme est très innovant pour la compréhension du processus de l'olfaction, il peut expliquer les troubles olfactifs dont souffrent certaines personnes en particulier lors de pathologies ou de leur traitement.

Il est extrêmement difficile d'étudier ces enzymes chez l'homme pour des raisons de disponibilité en tissus olfactif. Le rat présente un système olfactif très proche de l'homme, nous avons mis en évidence la fonction de ces enzymes en travaillant sur des explants de tissus olfactif de rat. Concernant la règle des 3R :

- Remplacement : il n'est pas possible de se passer des tissus de rat pour l'objectif de l'étude. Compte tenu de la complexité de ce tissu épithélial, aucune culture cellulaire ne peut présenter les caractéristiques d'un prélèvement à partir du rat.

- Raffinement : les animaux sont hébergés en cage de 3 avec enrichissement de milieu, les animaux ne subissent aucun geste technique durant leur hébergement

- Réduction : un maximum de 5 tissus olfactifs de rats sont utilisés pour chaque condition expérimentale ainsi que le contrôle, permettant une exploitation statistique des résultats (Test T) et donc une Réduction du nombre d'animaux. De même, nous avons mis au point des analyses sur des homogénats de tissus olfactifs permettant de Réduire le nombre de rat, puisque 10 analyses peuvent être réalisées sur un homogénat issu d'un seul rat.

Nous travaillons uniquement à partir d'explants de tissus olfactifs après dissection post mortem. Notre projet nécessite l'utilisation régulière de tissus olfactifs de rat à raison de lots d'une quarantaine de rats tous les 5 à 6 mois pendant 3 ans (soit au total environ 240 rats).

17082 Une avancée majeure dans le traitement des cancers a été réalisée au cours de ces dernières années grâce à l'utilisation de l'immunothérapie. L'immunothérapie consiste à réactiver les cellules du système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Bien que très efficace chez certains patients, une large proportion de personnes atteintes par le cancer ne répond pas à ces nouvelles thérapies (environ 80% des patients). De façon intéressante, de nombreuses études montrent à présent, que chez les patients

traités par certaines immunothérapies, l'ajout d'une vaccination dirigée contre des cibles appelées « antigènes » présentes à la surface des cellules tumorales peut améliorer la destruction de la tumeur et induire une rémission ou une stabilisation des patients. Dans ce cas, l'efficacité de la réponse vaccinale dépend directement de la nature des antigènes sélectionnés pour cibler les tumeurs et de la capacité du système immunitaire à reconnaître efficacement ces cibles tumorales.

Nous avons développé une méthode pour identifier des antigènes pouvant induire une forte réponse immunitaire contre des tumeurs. Notre méthode consiste à diriger le système immunitaire contre des cibles bactériennes très semblables à celles des tumeurs. Ainsi le système immunitaire reconnaît ces cibles comme étrangères et monte une réponse immunitaire forte contre les cibles tumorales comme si la réponse immunitaire était dirigée contre une infection bactérienne. Utilisés pour la vaccination des patients, ces cibles bactériennes jumelles aux cibles tumorales pourraient devenir un futur traitement pour ces cancers.

L'objectif de notre projet est de confirmer expérimentalement que cette stratégie fonctionne sur des antigènes de cancers liquides. L'obtention de données expérimentales est nécessaire à la validation de ce concept scientifique. De plus, les antigènes efficaces seront sélectionnés comme candidats vaccinaux pour des études cliniques.

Les antigènes sélectionnés doivent être définitivement validés dans des modèles animaux qui restent les seuls modèles permettant d'étudier une réponse immunitaire complète telle qu'elle est attendue chez l'homme.

Réduction : Le juste nombre d'animaux a été calculé de manière à réduire le nombre minimum d'animaux par lot, tout en produisant des résultats statistiquement significatifs et robustes.

Raffinement : De plus des outils de Bio-informatique et la réalisation de test *in vitro* a permis de ne sélectionner pour les études animales, que des peptides vaccinaux (antigènes) ayant une très forte probabilité d'engendrer une réponse immunitaire après vaccination.

Les animaux seront maintenus dans des conditions environnementales contrôlées (température, humidité, cycle jour / nuit), dans un espace suffisant, en groupe pour maintenir les interactions sociales, et avec un enrichissement environnemental permettant de répondre aux besoins physiologiques et comportementaux des souris. Toutes les manipulations seront donc réalisées dans le respect de l'animal. Le temps de manipulation des animaux sera de plus réduit au maximum afin de réduire le stress des animaux et l'impact possible sur la réponse immunitaire. La procédure expérimentale (vaccination) est de classe de gravité légère et ne nécessite pas d'y associer un protocole d'anesthésie. Les prises de sang régulières seront effectuées afin de suivre l'évolution dans la circulation sanguine, ce qui élève le niveau de la procédure à une classe modérée.

Remplacement : La reconnaissance des peptides / antigènes par le système immunitaire est dépendante de molécules capables de les prendre en charge (le complexe majeur d'histocompatibilité, CMH), ces molécules sont spécifiques de chaque espèce et sont donc différentes entre l'homme et la souris. L'étude de réponse immunitaire induite par nos candidats vaccinaux doit donc être réalisée chez des souris dites humanisées, qui expriment un des complexe majeur d'histocompatibilité humain, le CMH HLA-A2. Ce modèle de souris est parfaitement connu et maîtrisé en terme de réponse immunitaire aux vaccins peptidiques thérapeutiques restreints au HLA-A2 humain. Seule la réponse immunitaire engendrée par la vaccination sera analysée. Ce projet ne vise pas à l'évaluation directe d'une réponse anti-tumorale chez l'animal. La vaccination sera réalisée chez des animaux non porteurs de tumeur.

La mise en place d'une réponse immunitaire après vaccination est un phénomène complexe. L'étude d'une réponse immunitaire après vaccination sur organisme entier ne peut être remplacée et n'a pas d'équivalent expérimental n'utilisant pas d'animaux.

Ce projet sera composé de 12 études visant à étudier différents peptides/mélanges vaccinaux sur le modèle de souris. Toutes ces études peuvent être considérées comme similaires d'un point de vue expérimental. Ces études comprendront chacune au plus 48 animaux (8 groupes de 6 souris), soit un total maximum de 576 animaux.

17083 La ciguatéra est une intoxication alimentaire consécutive à la consommation de poissons coralliens ayant accumulé dans leur chair des ciguatoxines (CTX). Le syndrome clinique est dit polymorphe associant à la fois des signes cliniques digestifs, neurologiques, cutanés, cardio-vasculaires et respiratoires d'intensité variable. Les ciguatoxines (famille des polyéthers) ont pour cible le site 5 de la sous-unité alpha du canal sodium et leur fixation entraîne une augmentation de la perméabilité et de l'excitabilité membranaire, expliquant notamment les effets neurologiques qu'elles provoquent.

Les règlements CE N°853/2004 et CE N°854/2004 précisent que les contrôles doivent être effectués pour veiller à ce que les produits de la pêche contenant des biotoxines, telles que les ciguatoxines ou d'autres toxines dangereuses pour la santé humaine, ne soient pas mis sur le marché. Toutefois, il n'existe pas de seuil réglementaire pour les ciguatoxines au niveau européen.

L'European Food Safety Authority (Efsa) a rendu en 2010 un avis et n'a pas pu proposer de seuil de salubrité en raison du manque de données disponibles, aussi bien études toxicologiques chez l'animal que données épidémiologiques chez l'Homme.

La France est l'un des pays européens les plus touchés par la problématique de la ciguatéra de part la présence de cas d'intoxications régulièrement rapportées dans certains DROM (Réunion, Guadeloupe notamment).

Le projet actuel vis à analyser des échantillons de poissons soit issus de la pêche réunionnaise et mahoraise, soit importés. Les prélèvements sont réalisés dans le cadre de la surveillance réglementaire par les autorités compétentes, mais aussi dans le cadre de projets de prélèvements ciblés pilotés par des organismes locaux.

La seule méthode de référence pour la recherche de CTX dans les poissons est le bioessai sur souris, méthode validée par le LNR. Cela consiste en l'injection intra-péritonéale d'un extrait de tissu équivalent à 100g de tissus à 2 souris SWISS de 20g ($\pm 2g$). L'évaluation de la toxicité de l'échantillon est basée sur le délai de survie des souris. La mort de 1 ou 2 souris dans les 24h est interprétée comme un résultat positif pour la présence de ciguatoxines (non comestible). Une perte de poids supérieure à 5% 24h après injection sur au moins une souris sur deux est interprétée comme un résultat positif (limite de comestibilité).

Le nombre de souris nécessaire est estimé à 700 pour 5 ans, nombre réparti comme suit. Chaque année, nous devrions analyser en moyenne 60 échantillons de poissons nécessitant 2 souris, ce qui correspond à 600 souris testées sur 5 ans. Cette estimation est basée sur un prévisionnel établi avec les autorités de tutelle. De plus, sont réalisés des contrôles internes imposés par la méthode (solution d'injection, blanc solvant, échantillons références positif et négatif), réalisés deux à trois fois par an, et intégrés aux lots de souris conformes pour le bioessais. Le nombre de souris nécessaire pour ces contrôles internes est estimé à 20 souris par an (soit 100 au maximum sur 5 ans). Des essais intercomparaison entre le laboratoire et le Laboratoire National de Référence (LNR) sont réalisés annuellement (nombre d'animaux intégré au contrôle interne).

Concernant les conditions d'hébergement, les cages avec de la litière propre, enrichies avec un igloo, sont placées dans un environnement calme avec un maximum de 10 souris par cage. L'eau et la nourriture sont données ad libidum.

Des développements sont en cours pour remplacer ce test *in vivo* par une méthode chimique (LC/MSMS) et un test *in vitro* (cytotoxicité sur Neuroblastome). Plusieurs laboratoires communautaires développent actuellement ces techniques pour les ciguatoxines. Ainsi, le bioessai souris sera remplacé après validation des méthodes alternatives par le LNR (Laboratoire national de référence).

17084 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 abandonné avec l'arrivée des antibactériens synthétiques. Et le mécanisme par lequel l'irradiation thoracique, dans le passé, améliorerait 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 pratiquée 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 a 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 836 souris.

17085 Le but de cette étude est d'évaluer l'impact d'un traitement sur les déficits et la récupération fonctionnelle chez le rat. L'accident vasculaire cérébral (AVC) provoque une hypoexcitabilité dans le cortex moteur du péri-infarctus en raison d'une activité accrue de GABAergique sur les neurones. Alors que cette inhibition chroniquement élevée dans la région du péri-infarctus peut avoir un effet neuroprotecteur sur l'AVC, elle peut antagoniser la récupération fonctionnelle par la suite. L'effet de ce traitement a déjà été évalué sur la récupération fonctionnelle post-AVC chez le rongeur adulte. Les résultats ont montré que cette « molécule X » réduisait le déficit sensorimoteur induit par l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (ACM) lorsque le traitement est administré en bolus immédiatement après la reperfusion. Ce traitement a également amélioré la cognition chez les rats et que cet effet bénéfique était maintenu après 14 jours. L'effet de ce traitement sera donc évalué sur la récupération fonctionnelle dans un modèle d'AVC chez le rat (n=110 rats Sprague-Dawley mâles de 12 semaines). L'âge des animaux sera le même que dans les études réalisées en amont par le client. L'agence européenne des médicaments demande au client porteur de ce traitement, à ce qu'un laboratoire indépendant reproduise ses résultats afin de pouvoir valider la molécule avant les essais en phase 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). Ce modèle est aujourd'hui très bien caractérisé chez le rat. Notre projet correspond à l'étape de validation d'une stratégie thérapeutique avant la phase d'essai clinique. Aucun modèle informatique permettant de modéliser de tels mécanismes n'est à ce jour disponible. Ainsi, l'étude de la récupération fonctionnelle post-AVC 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. Dans un but de raffinement, 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 de ce modèle chez le rat adulte permettra de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés (n=110).

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.

17086 Le nouveau virus SRAS-CoV-2 qui a émergé à la fin de 2019 à Wuhan, en Chine, est très contagieux et se propage rapidement à travers le monde. Il constitue une menace sans précédent pour la santé mondiale et entraîne des pertes économiques importantes. Le développement d'approches prophylactiques efficaces contre le virus est un impératif absolu pour maîtriser la propagation de l'épidémie et pour atténuer l'apparition de la maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer dans un modèle d'hamster l'activité prophylactique des nouveaux candidats anti-COVID-19. Ils permettront de proposer une nouvelle méthode de prévention des personnes à risques.

Les nouveaux candidats seront préalablement testés *in vitro*. Toutefois, le rôle décrit du système immunitaire dans la lutte contre l'infection soulève l'importance de l'utilisation des modèles animaux. Pour cela nous allons mettre en place et caractériser un modèle d'infection pulmonaire chez les hamsters. En effet, ce modèle permet d'observer les caractéristiques majeures de l'infection chez l'homme : multiplication virale dans les poumons, cinétique de l'infection, réponse inflammatoire et guérison. Les animaux malades se rétablissent au bout de deux semaines : En effet, les animaux infectés par le virus auront une perte de poids durant les premiers jours (première semaine) ensuite ils vont se rétablir au cours de la deuxième semaine et reprendre progressivement leur poids initial.

Le projet comportera 3 procédures modérées, interdépendantes et progressives: nous allons établir *in vivo* :

(1) Un modèle d'infection pulmonaire d'hamsters avec différentes méthodes de caractérisations et de suivi (150 hamsters)

(2) Les concentrations et la répartition dans le sang et les organes infectés par le virus des candidats thérapeutiques et ceci à plusieurs temps après administration (1120 hamsters),

(3) L'efficacité des nouveaux candidats prophylactiques : le schéma de traitement prophylactique sera en fonction des résultats de la partie 2 et des caractéristiques de l'infection préalablement établie (partie 1).

L'absence d'un modèle *in vitro* pertinent permettant de reproduire les interactions virus/hôte/traitement, nous oblige à utiliser les modèles animaux. Le modèle hamster grâce à des similitudes avec l'homme au niveau du site de fixation du virus, permet de reproduire une partie de l'infection observés chez l'homme (l'infection pulmonaire et la réponse immunitaire). Ils sont ainsi prédictifs de la stratégie à déployer chez les malades.

Les hamsters seront infectés sous anesthésie générale. Ils seront examinés quotidiennement ce qui permettra d'établir un score clinique qui sera établi en fonction de l'observation de plusieurs paramètres: poids, comportement, posture. En fonction des observations et du score clinique associé, des décisions graduelles seront enclenchées : couverture chauffante, injection d'analgésique, réhydratation. Le score clinique permettra également de définir un point limite précoce et, en conséquence, de réduire la souffrance de l'animal ; dès le point limite atteint, il sera procédé à une mise à mort des animaux.

Pour réduire le nombre d'hamster à utiliser, des procédures successives et interdépendantes seront menées progressivement. Le nombre minimal d'animaux à inclure pour pouvoir appliquer des tests statistiques pour petits échantillons a été déterminé en collaboration avec des biostatisticiens).

Jusqu'à 2020 hamsters seront utilisées sur 5 ans, dans 3 procédures de sévérité modérée.

17087 Ce projet s'inscrit dans le cadre du renouvellement de stock des plasmas témoins (sans cortisol) de deux laboratoires impliqués dans des sujets de recherche concernant le bien-être et la santé animale.

Lors du dosage du cortisol par une méthode ELISA, du plasma témoin est nécessaire, c'est-à-dire un plasma ne contenant pas (ou le moins possible) de cortisol. Le cortisol est une hormone stéroïdienne produite à partir du cholestérol, il est synthétisé sous l'action d'une hormone hypophysaire, l'ACTH.

Il joue un rôle majeur dans la gestion du stress face à un danger, et on le dose pour évaluer le niveau de stress des animaux.

Afin d'obtenir ce plasma sans cortisol, les animaux reçoivent une injection intra musculaire de Dexaméthasone.

La dexaméthasone, stéroïde synthétique d'activité similaire à celle du cortisol (commercialisée sous le nom de : Dexadreson® ; Dexazone® ; Dexadreson®), inhibe la production d'ACTH par l'hypophyse et, par conséquent, la production de cortisol par les surrénales.

Après injection de la molécule, on s'attend à voir la cortisolémie chuter, et pouvoir ainsi récupérer du sang sans ou contenant peu de cortisol.

Le taux de cortisol augmente sensiblement 30 min après injection de la molécule puis redescend au bout de 120 min, pour atteindre une [cortisol] minimale entre 06H et 08H après injection de la dexaméthasone.

Afin d'obtenir ces plasmas d'intérêts, 5 ovins (mâles castrés) et 2 bovins (femelles) seront utilisés dès que le projet sera mis en place.

Nous prévoyons donc des triplicats d'animaux par espèce soit 15 ovins et 6 bovins sur la durée complète du projet.

L'application de la règle des 3R a été suivie avec i) un questionnement sur la possibilité de remplacer les animaux vivants par d'autres méthodes : dans le cadre de ce projet aucune alternative d'utilisation d'animaux vivants n'est possible, ii) réduire, en optimisant les effectifs en fonction des prélèvements nécessaires et de la quantité prélevée par animal et par espèce, iii) raffiner la méthode, en utilisant des animaux conduits en lots, en travaillant en collaboration avec un personnel formé à la contention des animaux et aux prélèvements de ces deux espèces et enfin en regroupant le besoin de deux laboratoires, au sein d'un seul projet.

17088 Le comportement alimentaire est un déterminant clé de la santé humaine et lorsqu'il est inadapté, il peut être à l'origine de plusieurs pathologies majeures affectant les sociétés modernes (obésité, maladies cardiovasculaires, diabète). Parmi les facteurs biologiques connus pour influencer le comportement alimentaire, la perception gustative joue un rôle important et varie fortement entre les individus. Néanmoins, peu d'informations sur les facteurs modulant cette perception, sont disponibles. Récemment, des études ont suggéré que le microbiote oral (ensemble des microorganismes présents dans la cavité buccale), jouerait un rôle prépondérant dans la modulation de cette perception. C'est pourquoi, nous avons formulé l'hypothèse qu'un régime riche en microorganismes exogènes issues d'aliments fermentés (fromages) pourrait moduler ce microbiote oral et cette modulation pourrait entraîner des modifications de certaines fonctions physiologiques orales, en particulier la perception gustative et les sécrétions salivaires.

Nos objectifs sont de savoir :

Premièrement, si les souches exogènes issues d'un fromage sont capables de s'installer dans la cavité buccale en colonisant celle-ci, et si cette colonisation est spécifique et perdure dans le temps

Deuxièmement, si la colonisation des bactéries exogènes issues d'un fromage peut impacter la composition salivaire ainsi que la perception du goût.

Pour cela, l'utilisation d'un modèle animal (rat) semble la plus pertinente pour plusieurs raisons :

- l'approche directe chez l'homme est peu envisageable en raison notamment des difficultés à uniformiser les conditions alimentaires et les modes de vie.

- les modèles *in vitro* ou *in silico* de l'écosystème buccal actuellement disponibles sont limités par leur capacité à accueillir simultanément une diversité de microorganismes. En effet ces modèles incluent quelques dizaines d'espèces bactériennes alors que le microbiote oral en contient plus de 800. Ils ne

permettent donc pas de mimer la complexité des interactions entre le microbiote et les phénomènes se produisant dans la bouche.

- les tests de préférence gustative sont validés depuis longtemps sur modèle rongeur, et plus particulièrement chez le rat. Il s'agit de méthodes non invasives reposant sur le choix entre deux biberons de saveurs ou de concentrations différentes (test des 2 bouteilles). Il est ainsi possible de déterminer le seuil de sensibilité (perception) pour une saveur spécifique.

Dans ce projet, il s'agira de comparer 3 groupes de 27 rats (soit 81) Wistar mâles de 10 semaines (en début d'expérience), un groupe témoin nourris avec un régime standard, et deux autres groupes recevant un fromage soit stérile, soit enrichi en bactéries couramment utilisées dans l'industrie laitière. La durée de l'expérience est de 7 semaines, incluant une phase d'acclimatation (2 semaines), une phase de consommation des régimes fromages, (3 semaines) et une phase de retour au régime standard (2 semaines) afin d'évaluer la résilience des facteurs étudiés. Un suivi quotidien des animaux permettra de contrôler l'état sanitaire et d'appliquer les mesures d'éthiques pertinentes en cas d'atteinte des points limites. Les expérimentateurs, le personnel de l'animalerie ainsi que les membres de la Structure chargée du Bien-Etre Animal (SBEA) veilleront aux conditions optimales d'hébergement et d'utilisation des animaux.

Ce projet répond aux exigences des 3R :

-Réduire : Le nombre d'animaux par expérience (81) a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables (test de puissance) tout en diminuant au maximum la taille des groupes afin d'atteindre l'objectif scientifique du projet.

-Raffiner : Des prélèvements non invasifs (salive, fèces) seront effectués régulièrement (3 fois) durant les 7 semaines de l'étude de façon à s'assurer de pouvoir répondre clairement aux questions du projet. Ces prélèvements seront effectués de façon optimale de façon à générer des données brutes reproductibles et fiables. Ces prélèvements n'entraînent pas de douleur. Pour maîtriser la consommation alimentaire individuelle des animaux et effectuer les tests sensoriels, ceux-ci doivent être constamment hébergés en cage individuelle. Cependant les cages sont proches entre elles, permettant aux animaux de voir et de sentir leurs congénères ; elles comprennent également des éléments d'enrichissements (tunnels, nids). Une période d'acclimatation est prévue pour réduire le stress des animaux (arrivée dans les locaux, manipulations régulières...) ainsi qu'un suivi quotidien de l'état général des animaux.

-Remplacer : Compte tenu de l'approche intégrative du projet, reliant des tests de préférence à des perturbations physiologiques (salive) et de la microbiologie, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle alternatif, tant *in vitro* qu'*ex-vivo*.

17089 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative incurable caractérisée par la perte de cellules nerveuses (appelées « neurones moteurs), qui contrôlent les muscles. Cette perte de neurones moteurs entraîne une atrophie musculaire et une paralysie progressive menant au décès du patient. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif.

Dans la SLA mais également lors des processus de dénervation musculaire il existe une altération du métabolisme des lipides (processus utilisant les graisses comme source d'énergie essentielle pour le fonctionnement optimal des muscles). Notre hypothèse est que la modulation des lipides permet le maintien et la régénérescence du dialogue neurone moteur-muscle dans les situations pathologiques. Il est également aujourd'hui connu que le métabolisme des lipides influence la sévérité et la progression de la SLA lorsqu'il est altéré. Dans ce projet, nous allons tester une molécule capable de moduler le métabolisme des lipides chez un modèle murin de SLA. Ce modèle récapitule l'ensemble des atteintes tant motrices que métaboliques de la maladie et aboutit à une dénervation des muscles et la mise en place d'une paralysie progressive. Ce projet nous permettra de déterminer si la molécule pourrait être testée dans le traitement de la SLA afin de favoriser le maintien et/ou la régénération des connexions entre les neurones moteurs et les muscles.

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.

Remplacer : la molécule sélectionnée a été caractérisée au préalable *in vitro* pour son activité et ses caractéristiques physicochimiques. Cependant, la SLA est une maladie d'origine multifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser l'aspect intégré et comportemental de cette pathologie et leur mise en place progressive. 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.

Réduire : Compte tenu de la variabilité interindividuelle, nous utiliserons au maximum 159 souris sur 3 ans (soit 12 souris transgéniques et 10 souris non-transgéniques par groupes), ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables et robustes en termes statistiques. 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 comportementales et 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 des 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 post-hoc pour la comparaison de plus de deux groupes expérimentaux.

Raffiner : 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. Les animaux sont hébergés en cohorte, dans un milieu enrichi (bâtonnets à ronger, coton compressé pour faire des nids, maisons en plastique rouge). Le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux (par l'expérimentateur ou une personne compétente) 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 prédictifs adaptés ont été déterminés afin d'interrompre les procédures s'ils sont atteints, limitant ainsi la douleur animale à son minimum. De plus, nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes d'anesthésie pour les études électromyographiques.

17090 L'accident de décompression (ADD) représente le risque le plus grave chez les plongeurs subaquatiques professionnels et de loisir, mais concerne aussi l'ensemble des personnes exposées à des diminutions de la pression ambiante : patients et personnels des chambres hyperbares, pilotes (en cas de montée rapide en altitude), astronautes (lors des sorties spatiales extravéhiculaires), tunneliers ... Les symptômes de l'ADD vont de la simple démangeaison passagère jusqu'à la paralysie définitive ou, à l'extrême, au décès. Dans le cas d'ADD avec lésion de la moelle épinière, qui constitue la majorité des accidents de plongée (40 à 45 %, soit 120 à 130 cas par an en France), 20 à 30% des plongeurs accidentés conservent des séquelles neurologiques de gravité variable dont 10 % de formes invalidantes. Il est donc nécessaire d'améliorer l'efficacité du traitement de cette pathologie.

Une étude précédente a montré que l'administration intraveineuse de nanocapsules d'albumine contenant du perfluorodecaline (un transporteur d'oxygène), avant une plongée simulée, diminue la sévérité et l'incidence de l'ADD chez un modèle murin d'ADD. Cependant, leur administration doit être plus proche de la réalité en les injectant au moment de l'apparition des symptômes juste après la plongée simulée du modèle murin d'ADD.

Cette étude pilote est un prérequis pour pouvoir tester, à terme, l'effet de ces nanocapsules en prévention secondaire de l'ADD. Elle est constituée de deux procédures :

La procédure 1 permettra de mettre en place la voie d'accès pour l'injection de notre molécule d'intérêt, et dans la procédure 2, les animaux seront soumis à un protocole standard de plongée fictive en chambre hyperbare, à l'issue duquel ils recevront, grâce à cette voie d'abord, une solution saline, stérile injectable.

20 rats mâles de la souche wistar seront utilisés dans ce projet.

Cette étude sera conduite conformément à la règle des 3R,

•Remplacement : les symptômes de l'ADD étant exclusivement comportementaux, le remplacement par des modèles *in vitro* est impossible.

•Réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum en limitant l'effectif au minimum nécessaire pour permettre la mise au point de la procédure 1, la procédure 2 étant parfaitement maîtrisée au laboratoire.

•Raffinement : Les rats sont hébergés selon les normes de soins et d'hébergement (article R.214-95 du code rural et de la pêche maritime). Ils sont disposés dans des cages réglementaires enrichies de tunnel en plexiglas. Ils observent une phase d'acclimatation de cinq jours minimum avant d'entrer dans une procédure et sont observés quotidiennement pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux. La procédure 1 est réalisée sous anesthésie générale en condition d'asepsie par des concepteurs possédant le diplôme de chirurgie. Le suivi du bien-être des animaux est réalisé quotidiennement par les concepteurs (à l'aide d'une grille de suivi de soins, de l'établissement de point limite et de l'utilisation d'antalgie post-opératoire adaptée) ; pour la procédure 2, des points limites ont été définis sur la base de nos précédentes études afin de limiter au minimum nécessaire la souffrance liée à l'accident de décompression infligée aux animaux.

17091 L'hémophilie A et B sont des maladies génétiques dues à un déficit en deux facteurs de la coagulation distincts. L'hémophilie est caractérisée par un défaut de génération de l'enzyme clé de la coagulation, la thrombine, qui est responsable de la formation des caillots sanguins, et par conséquent par des hémorragies spontanées ou prolongées. En France, on compte près de 7 000 patients hémophiles dont la moitié atteints d'hémophilie sévère. Les traitements actuels comprennent en général un traitement substitutif par le facteur déficitaire. La généralisation de ce traitement a fait de l'hémophilie une maladie chronique. Une des complications cliniques chez les hémophiles est la destruction importante des articulations dues aux hémarthroses répétées. L'hémarthrose est un épanchement de sang dans une articulation qui peut survenir spontanément chez un patient hémophile et être responsable d'un handicap majeur. De nos jours, l'un des principaux enjeux est la prévention de l'hémarthrose et des atteintes articulaires. Nous avons proposé une approche innovante qui consiste à cibler une protéine qui bloque l'enzyme centrale de la coagulation de façon très efficace. L'absence de cette protéine diminue les saignements des souris hémophiles et améliore la production de la thrombine *in vitro* dans les plasmas issus de patients hémophiles. Nous souhaitons établir si le ciblage de cette protéine bloquante peut aussi protéger les articulations cibles des hémarthroses chez les hémophiles. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'hémarthrose sur une lignée de souris génétiquement modifiées hémophiles et produisant ou non cette protéine bloquante, réalisé sous anesthésie et analgésie par piqure de l'articulation.

Les animaux seront euthanasiés après 5 ou 14 jours pour l'analyse des saignements et de l'atteinte articulaire, respectivement, et le sang et les tissus seront prélevés et stockés pour les analyses biologiques. Ce projet a été élaboré en respectant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Seul le recours à l'animal peut permettre de reproduire l'atteinte articulaire liée aux saignements chez les hémophiles et donc de définir un potentiel traitement thérapeutique car l'hémarthrose est un processus physiologique complexe qui ne peut pas être reproduit *in vitro*. Le modèle d'hémarthrose chez la souris est bien décrit et reproduit la pathologie humaine. Ce projet nécessite 120 souris pour l'ensemble des procédures expérimentales sur une période de 5 ans. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, en tenant compte des temps d'analyse et des différentes lignées de souris. 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, établi grâce aux publications obtenues avec ce modèle animal. Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de vérifier le bien-être des animaux et la présence de signes de souffrance grâce à la mise en place d'une grille de scoring. La prise en charge de la douleur se fera dès le début de l'expérience et durant toute sa période par l'administration d'analgésiques. Une persistance ou une amplification de la douleur ainsi que l'apparition de point limites entraînerait l'euthanasie des animaux.

17092 La fonction des cellules spécifiques cérébrales codant pour la direction de la tête chez la souris est cruciale pour assurer la navigation et l'orientation dans l'espace de l'animal.

Néanmoins, et malgré les résultats obtenus par le biais d'études de modèles réalisés par ordinateur, indiquant notamment des mécanismes spécifiques d'activation fonctionnelle de ces cellules et leur

implication dans le contrôle du comportement de l'animal, des preuves expérimentales confirmant ces hypothèses font toujours défaut à ce jour.

La navigation dans de nouveaux espaces est fondamentale chez tous les animaux, mais les mécanismes qui régissent le comportement de l'animal sont encore inconnus. C'est pourquoi cette étude est cruciale dans la compréhension des mécanismes par lesquels le cerveau traite différentes informations spatiales d'origine externe, afin de permettre la prise de décision et le contrôle du comportement chez l'animal.

Pour ce faire, nous procéderons à l'activation artificielle des neurones par l'usage de la lumière (une technique courante nommée optogénétique) de neurones dans 3 régions avec un taux élevé de cellules de direction de la tête.

Ce groupe sera utilisé afin de définir les paramètres optimaux pour les stimulations optogénétiques (adaptation de la fréquence et de la puissance de la lumière, durant différentes expériences) qui entraîneront des modifications du comportement de la souris.

Après avoir identifié les paramètres optimaux pour les stimulations optogénétiques, nous enregistrerons, par électrophysiologie (technique permettant d'enregistrer l'activité neuronale par implantation d'une électrode dans la région d'intérêt), les variations d'activité neuronale dans la population de neurones stimulés. Par le biais de cette approche combinée il nous sera possible de répondre à une question fondamentale : dans quelle mesure les cellules de direction de la tête contrôlent-elles le comportement chez la souris?

Pour réaliser ce projet sur une durée de 5 ans nous utiliserons au total 240 souris C57Bl6X129.

Toutes les expériences comportementales que nous effectuons n'induisent aucune douleur et/ou stress à l'animal.

Remplacer : Du fait des approches intégratives de ce projet, l'utilisation d'animaux entiers restent incontournables et ne peuvent être effectuées chez l'homme. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthodes substitutives *in vitro*, *ex vivo* ou *in silico* pour obtenir des données sur ces processus cognitifs complexes. Le modèle rongeur est modèle idéal du fait de ses capacités de créer des souvenirs simples (que nous sommes intéressés à étudier et de sa petite taille.

Réduire : Le nombre d'animaux est limité au nombre minimal permettant de faire des études statistiques, nombre choisi sur la base d'expériences présentées dans des articles montrant des analyses similaires. Les procédures expérimentales ont été raffinées de façon à garantir le bien-être animal tout au long des expériences. Nous utilisons également les tissus d'animaux après les expériences maximisant ainsi l'utilisation de chaque animal.

Raffiner : En conformité avec la réglementation, une anesthésie et analgésie appropriées seront incluses dans les procédures chirurgicales ; Enfin, les expériences ont été pensées pour répondre à la question scientifique tout en réduisant au maximum l'inconfort, en limitant les contraintes au cours des procédures et en préservant le bien-être des animaux.

17093 Ce projet à vocation pédagogique s'inscrit dans le cadre de travaux pratiques. il s'agit de mettre en évidence le rôle joué par les glandes surrénales (qui sécrètent notamment aldostérone, corticostérone, catécholamines...) dans l'équilibre hydrominéral, c'est-à-dire l'état d'hydratation de l'organisme et la teneur en sels minéraux (sodium et potassium), et également dans le contrôle du métabolisme du glucose à l'état nourri et à l'état à jeun. En effet le jeûne est un stress métabolique qui entraîne une adaptation de plusieurs organes afin de converger vers le maintien du taux de glucose sanguin, le glucose étant crucial pour le fonctionnement des neurones, toute baisse de la glycémie (<35 mg/dl) peut conduire à la perte de conscience, au coma puis à la mort.

Ainsi les étudiants, qui fonctionnent en binôme, auront à effectuer des prélèvements sur un rat normal : « témoin nourri », qui leur permettra d'obtenir des valeurs de référence pour la glycémie, l'hématocrite (pourcentage de cellules/sang total, reflet de l'état d'hydratation), les concentrations en sodium et potassium sanguin, la concentration en acides gras libres plasmatiques... Ils réaliseront également des mesures sur des échantillons de foie, afin de déterminer « la réserve de glycogène », c'est-à-dire la

forme de stockage du glucose, et l'activité d'une enzyme, la tyrosine aminotransférase, qui reflète la formation de glucose de novo ou néoglucogénèse.

Chaque binôme aura également un rat dit « expérimental » : témoin à jeun, surrénalectomisé nourri, surrénalectomisé à jeun, surrénalectomisé à jeun + dexaméthasone (dans ce dernier groupe, la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, est supposé pallier en partie l'absence de glande surrénale). Les étudiants pourront donc apprécier l'effet métabolique du jeûne, de la surrénalectomie, et de l'association de ces deux paramètres, et analyser si leurs résultats sont cohérents avec leurs connaissances sur le métabolisme glucidique et les hormones sécrétées par les glandes surrénales (aldostérone, corticostérone, catécholamines...)

Afin de permettre une conclusion générale avec un nombre d'animal suffisant par groupe, les étudiants ont une séance d'analyse des résultats la semaine suivant leur TP, les deux salles de TP sont alors fusionnées, ainsi que les résultats obtenus.

4 séances de TP sont prévues, pour 1 groupe d'environ 16 étudiants un total de 12 rats est utilisé, soit par année universitaire : 48 rats, et pour 5 ans : 240 rats.

Une attention particulière est portée à la règle des 3R tout au long de l'étude, ainsi la surveillance journalière des animaux en post-opératoire permet de dépister tout mal-être ou souffrance. Concernant l'engagement de réduire le nombre d'animaux, il a été décidé que 2 binômes d'étudiants se partagent l'animal témoin (dont les paramètres biologiques sont connus et peu fluctuants, contrairement aux animaux expérimentaux, dont 1 est fourni par binôme), soit 3 rats pour 4 étudiants. ce TP a pour but de former les futurs physiologistes et ne peut donc pas être remplacé par des approches *in vitro*.

17094 Le cancer colorectal (CRC) est le troisième cancer le plus fréquent et la quatrième cause de décès par cancer dans le monde. Chaque année, 1,4 million de nouveaux cas de CRC sont déclarés (OMS, 2012). Au même temps, les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) ont causé 51000 décès dans le monde en 2013 et sont en augmentation en Europe. Les maladies inflammatoires chroniques du tractus digestif sont connues pour augmenter le risque d'un type de cancer colorectal associé à l'inflammation. Les rôles de l'inflammation dans la formation et le développement de la tumeur ont été largement étudiés dans un modèle de souris appelé Apc/Min. Ces souris contiennent une mutation ponctuelle dans un gène et ne développe que des lésions précancéreuses dans l'intestin, les adénomes bénins. Le traitement des souris Apc/Min avec un agent chimique provoque une inflammation du tube digestif et favorise le développement des tumeurs colorectales, faisant ainsi un modèle bien établi pour l'étude de l'induction inflammatoire de la tumorigénèse dans le côlon

D'un autre côté, il a été récemment décrit qu'une voie de signalisation hyperproliférative est activée mécaniquement dans le cancer du côlon de la souris. La pression provoquée par une tumeur qui croît dans le côlon active cette voie de signalisation dans les cellules saines voisines comprimées, ce qui cause l'expression de différents gènes hyperprolifératifs dans les tissus, participant ainsi à la progression de la tumeur. Parce que cette voie active en plus des voies anti-inflammatoires, nous sommes par ailleurs actuellement en train d'étudier le rôle des contraintes mécaniques du péristaltisme endogène (contractions musculaires qui assurent la progression du contenu du tube digestif) dans la réponse anti-inflammatoire du côlon, en vue d'une application clinique pour le traitement des pathologies inflammatoires du côlon, la maladie de Crohn et les recto-colites ulcéro-hémorragiques. En effet, contrairement aux contraintes permanentes tumorales pathologiques, les contraintes pulsées péristaltiques semblent avoir un effet physiologique anti-inflammatoire.

L'objectif du présent projet consiste alors à tester l'effet d'une stimulation mécanique péristaltique externe (contraintes intermittentes produites de l'extérieur de l'organisme) sur l'inhibition de l'inflammation du côlon en vue d'une application clinique pour le traitement du cancer colorectal induit par l'inflammation. Il est aussi de tester si le traitement avec un inhibiteur de la voie de signalisation hyperproliférative réduit la tumorigénèse induite par inflammation.

Pour atteindre cet objectif, nous allons induire la tumorigénèse du côlon par inflammation avec un agent chimique sur le modèle Apc/Min (seule méthode connue à ce jour pour induire la tumorigénèse par inflammation chez la souris) et nous allons ensuite utiliser 3 méthodes pour réduire la tumorigénèse :

1) stimulation magnétique : les souris, préalablement injectées avec des particules aimantées pour magnétiser le côlon à l'aide d'un aimant implanté dans le dos, seront soumises à un champ magnétique intermittent mimant les contraintes péristaltiques endogènes du côlon.

2) stimulation acoustique : les souris seront anesthésiées et soumises via une sonde échographique à des pulsations acoustiques intermittentes.

3) stimulation chimique : les souris seront traitées avec un inhibiteur commercialisé de la voie de signalisation hyperproliférative

Le nombre total des souris pour cette étude sera de 142.

3R (remplacer, réduire, raffiner) :

Les questions posées dans ce projet ne peuvent être investiguées avec des modèles cellulaires *in vitro* et requièrent une complexité tissulaire qui ne peut être récapitulée qu'*in vivo*. Pour les études précliniques, la souris est le modèle plus approprié avec des techniques déjà bien établies permettant de mimer les maladies humaines. Les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de nos précédents projets nous permettent de réduire et ajuster le nombre de souris nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement fiables.

L'implantation de l'aimant et l'injection de particules aimantées seront réalisées sous anesthésie. Des soins avec la Bétadine® seront apportés après la pose sous cutanée de l'aimant pour contrôler la cicatrisation.

Les souris traitées avec l'agent chimique seront pesées quotidiennement et dans le cas d'une déshydratation (maintien d'un pli de peau dorsal) une réhydratation en injection intrapéritonéale sera mise en place. Pour réduire la douleur éventuelle générée par l'inflammation nous allons aussi leur administrer un analgésique morphinique. Les animaux seront suivis quotidiennement et les expérimentations contrôlées de façon à minimiser et prévenir la douleur chez la souris.

17095 Les leucémies aiguës représentent environ 1% des cancers, soit 3 250 nouveaux diagnostics en 2012 en France (Santé Publique France). Les traitements actuels reposent sur la chimiothérapie en association avec la greffe de moelle mais le pronostic global reste médiocre (survie à 5 ans : 5 à 40%) en raison de la fréquence élevée des rechutes. Ces rechutes sont causées par la persistance des cellules souches leucémiques (CSL) insensibles aux thérapies actuelles. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc un enjeu majeur dans cette pathologie. Ce projet scientifique vise à évaluer l'efficacité *in vivo* de deux nouveaux médicaments. Ces médicaments ont déjà été testés *in vitro* sur des cellules leucémiques de patients et ont montré une très bonne efficacité. Les cellules de patients ne pouvant être maintenues en culture que quelques jours, il est nécessaire de les greffer dans des souris immunodéprimées afin d'évaluer l'efficacité *in vivo* de ces médicaments. Il n'est donc pas possible de mettre en place des méthodes de substitutions qui évitent l'emploi d'animaux vivants. Pour le premier médicament nous utiliserons un modèle où les souris recevront une greffe de cellules tumorales issues de la moelle osseuse de patients leucémiques par injection intraveineuse. Le second médicament sera testé sur un modèle où les souris recevront par voie sous-cutanée des cellules de lignées leucémiques humaines. Nous étudierons aussi pour ce médicament sa toxicologie et sa pharmacocinétique par injection intra-péritonéale ou intra-veineuse puis en réalisant des prélèvements sanguins.

Les souris seront surveillées de façon quotidienne et si l'un des points limites est atteint il y aura une mise à mort anticipée de l'animal. Des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à la disposition des souris : cotons, maisonnettes en carton et bâtonnets à ronger.

Ce projet a été élaboré selon la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisés à chaque procédure est nécessaire étant donné la variabilité de la prise de greffe d'une souris à l'autre. Il est suffisant pour exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats de l'expérience et permet de réaliser une analyse statistique fiable.

Ce projet qui nécessitera d'utiliser 810 souris au maximum sur une période de 3 ans nous permettra d'évaluer l'efficacité, la pharmacocinétique et la toxicité *in vivo* de nouvelles cibles thérapeutiques dans la leucémie aiguë.

17096 *Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène particulièrement fréquente dans les infections acquises en ville (« communautaires ») et les infections acquises à l'hôpital (« nosocomiales »). Ce pathogène, en plus d'être doté d'un grand nombre de facteurs de virulence et de toxines est associé à une résistance élevée aux antibiotiques.

Dans ce contexte, des alternatives innovantes (anticorps) sont actuellement en développement et visent à neutraliser la ou les toxines pathogènes produites par *S. aureus* afin d'en diminuer la virulence.

Le but de cette étude est donc d'évaluer l'efficacité de différentes doses d'anticorps SYN100 dans un modèle de septicémie à *Staphylococcus aureus* chez la souris. La durée de l'étude sera d'un mois et concernera au maximum 66 animaux.

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 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 de l'anticorps SYN. 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). D'une façon générale pour l'ensemble de l'étude, la prise d'anti-inflammatoires est contre indiquée du fait de l'interaction reconnue avec les modulateurs de l'inflammation, ce qui risquerait même de faire flamber l'infection. Cependant, si l'animal présente des souffrances extrêmes (convulsions, détresse respiratoire, animal amorphe et non réactif aux stimuli), alors une mise à mort prématurée sera mise en place. De plus, les souris seront surveillées trois fois par jour à partir du jour de l'infection.

17097 Les troubles ou perturbations musculaires peuvent être observés dans différentes pathologies comme dans la sarcopénie (diminution des capacités musculaires liée à l'âge), après une infection, au cours du vieillissement et/ou suite à une malnutrition.

Par exemple, les causes de la diminution des capacités musculaires liée à l'âge sont multifactorielles et incluent le vieillissement, les maladies, l'inflammation, l'augmentation du stress oxydatif, la diminution de l'activité physique, la malnutrition, un déficit hormonal et des changements structurels musculaires. La sarcopénie est un syndrome gériatrique se caractérisant dans un premier temps par une diminution des capacités musculaires due à l'âge et qui en s'aggravant sera à l'origine d'une détérioration de la force musculaire et des performances physiques. Elle est imputable au processus de vieillissement mais peut être accélérée par des facteurs pathologiques et comportementaux tels que la dénutrition et la sédentarité. Dès l'âge de 30 ans, le tissu musculaire subit une dégénérescence progressive de l'ordre de 3 à 8% par décennie, avec une accélération dès 50 ans. A 70 ans nous avons perdu la moitié de notre masse musculaire au profit du tissu adipeux. Différentes études estiment que 25% des personnes de plus de 70 ans et 40% des plus de 80 ans seraient sarcopéniques. A l'hôpital, la sarcopénie touche 21 à 44 % des personnes de plus de 65 ans dénutries ou à risque de l'être. Il en résulte une faiblesse musculaire entraînant des chutes, davantage de morbidité et une perte d'autonomie fonctionnelle.

Parmi les options thérapeutiques, il y a l'exercice physique avec ou sans apports nutritionnels, mais actuellement, aucun traitement spécifique à cette indication n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché.

Des traitements à évaluer ont fait et font toujours l'objet de test en lignées cellulaires, mais la confirmation des résultats nécessite un passage chez l'animal. Les troubles ou perturbations musculaires sont des syndromes multifactoriels, donc les modèles sur cultures de cellules ne permettent pas d'étudier dans leur ensemble les perturbations observées au cours du développement de ces pathologies. Des études sur des modèles animaux reproduisant la pathologie humaine sont nécessaires pour déterminer les effets de nouveaux traitements potentiels.

Par exemple, chez la souris C57BL/6J, les fonctions musculaires commencent à décliner à partir de l'âge de 13 mois. Chez le rat mâle Sprague-Dawley, le poids corporel augmente jusqu'à l'âge de 6 mois puis se maintient et diminue très légèrement jusqu'à 27 mois.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'effet de différents produits qui pourraient diminuer ou améliorer les symptômes évalués au cours des troubles ou perturbations musculaires chez le rongeur (rat et souris). Ils seront évalués à travers plusieurs paramètres : évolution du poids corporel, activité locomotrice spontanée, activité locomotrice stimulée, force musculaire, poids des muscles des pattes arrière, analyses biochimiques du sang et de certains tissus (muscles), histologie des muscles, notamment. Dans certaines études, un prélèvement ex-vivo des muscles des pattes arrière et/ou avant permettra de mesurer leur contractilité *in vitro* dans un système à organes isolés, et de déterminer les effets des produits étudiés.

Lors de ce projet, 4 procédures sont envisagées pour reproduire des troubles musculaires observés lors de différentes maladies : chez l'animal âgé, chez l'animal dénutri, lors d'une atrophie musculaire induite par un corticoïde, et lors d'une asthénie post-infectieuse.

Le nombre d'animaux utilisés est le plus petit permettant de mettre en évidence un effet pharmacologique statistiquement significatif, c'est-à-dire 12 animaux par groupe. Ce nombre se décompose de la manière suivante pour une procédure : 12 animaux x 4 groupes x 5 produits étudiés x 2 espèces (rats et souris) x 2 genres = 960 animaux par an. Soit 480 animaux au maximum par espèce et par an, et 2400 animaux au maximum par espèce pour 5 ans et une procédure. Dans le projet, il y a 4 procédures décrites qui impliquent des mécanismes différents, mais elles ne seront pas toutes utilisées pour chaque produit. Au maximum, 4800 animaux seront utilisés pour la durée maximale du projet (5 ans) pour une procédure, soit au plus 19200 animaux pour 4 procédures.

Les animaux sont hébergés dans des conditions environnementales répondant à leurs besoins, avec un enrichissement adapté (tunnel, coton, sizzle dry, ...). Un suivi quotidien de leur bien-être, dès leur arrivée, et l'application de points limites au cours des traitements seront réalisés pour réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété.

Durant les procédures, des prélèvements sanguins des animaux se feront sous anesthésie afin de réduire l'inconfort et le stress des animaux. Les animaux seront placés sur des tapis chauffants lors de l'anesthésie pour éviter une hypothermie. Lors de certaines études, des prélèvements de muscles seront réalisés dans les mêmes conditions, puis les animaux seront sacrifiés.

17098 Les topiques cutanées et autres produits de traitement adjuvants sont fréquemment utilisés pour le soin des chiens atteints de dermite. Leur composition emploie des produits naturels comme les huiles essentielles végétales. Bien qu'ils ne soient pas tous considérés comme des médicaments, ces produits peuvent être mal tolérés et il est donc nécessaire de les tester sur la peau de chiens sains ou sur la peau de chiens présentant un défaut de perméabilité cutanée.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'innocuité de nouveaux mélanges composés entre autres d'huiles essentielles appliqués sur peau saine et sur peau altérée, chez le chien.

L'application de ces produits provoque rarement d'intolérance, toutefois, il peut arriver qu'une gêne ou une irritation soit observée et dans ce cas, les chiens sont immédiatement retirés des études et ils sont traités par des vétérinaires spécialisés. Les chiens sont parfois hébergés dans ces enclos où ils sont seuls, mais dans ce cas, ils sont en contact avec leurs congénères et le personnel du laboratoire vient leur rendre visite plus souvent et ils ont accès à des jouets. Quelques prélèvements, comme des biopsies de peau peuvent être effectués, mais ils sont faits sous anesthésie locale.

Pour ce projet, Il est envisagé d'utiliser, au maximum, 25 chiens. Ce qui représente 5 études utilisant 5 chiens, sur 5 ans. Ces chiens sont tous des chiens réutilisés d'autres projets, et ils sont ensuite maintenus en groupe, jusqu'à leur adoption par des particuliers.

La réponse aux questions scientifiques posées implique le suivi des différentes étapes. Pour cela, un examen clinique et l'étude du comportement de l'animal, seront effectués quotidiennement et de façon rigoureuse. Ainsi, des études chez l'animal vivant permettent de réunir tous ces paramètres et d'observer l'évolution au cours du temps.

Pendant toute la durée du projet, tout sera mis en œuvre pour assurer un confort optimal des animaux, en particulier, un enrichissement du milieu sera mis en place, à l'aide de jouets, de caresses et récompenses lors des examens cliniques, etc.

Tous les gestes techniques seront effectués par du personnel entraîné spécifiquement pour le travail avec ces espèces animales.

En cas de réaction inflammatoire trop importante ou signes de douleurs extrêmes, le chien sera sorti de l'étude et traité avec un médicament adapté.

17099 Le développement préclinique consiste à évaluer *in vivo*, dans des systèmes vivants non humains et sain, l'activité de candidats médicaments issus de la recherche préclinique telle que la culture cellulaire ou la modélisation informatique. L'expérimentation animale est alors une étape indispensable pour vérifier l'innocuité d'un futur médicament avant son administration à l'Homme. En effet, il n'est pas envisageable d'administrer un nouveau composé à l'Homme sain ou malade sans au préalable évaluer les risques pouvant apparaître.

Pour cela, des études de pharmacocinétique, de pharmacodynamique et de toxicité aiguë doivent être effectuées pour obtenir l'autorisation de réaliser des tests cliniques. L'effet thérapeutique d'un candidat médicament ou d'un vaccin dépend de la pharmacocinétique, qui désigne l'étude du devenir des médicaments dans l'organisme, il s'agit de quantifier son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme et son élimination; la pharmacodynamique, qui concerne l'action des molécules sur l'organisme afin de valider son mécanisme d'action et de mesurer son activité; enfin la toxicité aiguë qui permet d'évaluer l'effet de la molécule à tester sur les organes cibles (foie, reins, poumons, ...) du candidat médicament pour un organisme vivant. La détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future.

Ce projet consiste à étudier le devenir des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur sain qui est une étape essentielle dans le développement d'un candidat médicament afin de démontrer sa bio-distribution et biodisponibilité dans un organisme vivant. En effet pour développer un composé, il est indispensable d'étudier sa pharmacocinétique et de vérifier l'absence de toxicité. Cette caractérisation des paramètres pharmacocinétiques permet par la suite de déterminer entre autres les voies d'administration et la posologie. Il est donc essentiel de développer ces études de pharmacocinétique chez un animal en bonne santé. Les molécules à tester peuvent être administrées par voie orale, intranasale, intrapéritonéale, intratrachéale, intraveineuse ou sous-cutanée, à dose unique ou répétée. Les animaux seront mis à mort 5 minutes à 1 an (étude de vaccins par exemple) après administration du candidat médicament. Les paramètres immunologiques et histologiques pourront être mesurés à partir des tissus prélevés tels que le sang notamment mais aussi le foie, la rate, les poumons...

Les animaux utilisés sont la souris C57BL/6, la souris BALB/c, le rat Wistar, le rat Sprague Dawley.

Nous n'attendons pas de douleurs à l'animal dans ce modèle, cependant certains candidats médicaments peuvent avoir des effets secondaires comme la perte de poids ou la somnolence comme observé chez certains médicaments couramment administrés à l'Homme tels que le Tiotropium par exemple. Des études toxicologiques sont réalisées en amont par le laboratoire pharmaceutique ou le laboratoire de recherche publique donneur d'ordres. La dose du composé est choisie en fonction des études *in vitro* (sur cellules) réalisées en amont par le laboratoire pharmaceutique ou de recherche publique donneur d'ordres. La dose du composé est sélectionnée en fonction de:

- la DL50 (dose létale) qui est la dose qui entraîne la mort de 50% des cellules
- l'IC50 ou IC90 (concentration inhibitrice) qui définit la concentration de produit nécessaire pour diminuer de 50% ou de 90% une fonction biologique ou biochimique spécifique. La dose ayant un effet sur les cellules doit induire moins de 20% de mortalité cellulaire pour pouvoir être administrée aux animaux.

D'une façon générale on se base sur l'IC50 ou l'IC90 *in vitro* en souhaitant avoir au moins 2 fois l'IC50 ou 1 fois l'IC90 comme concentration minimale sur 12h (pour un composé administré 2x/jour) ou 24h (pour un composé administré 1x/jour) selon la pharmacocinétique du produit.

La dose optimale choisie est donc en dessous de la DL50 et correspond à la dose induisant un meilleur effet thérapeutique avec le moins d'effets indésirables.

Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les souris sont hébergées par 5 dans des compartiments de 530 cm², et les rats sont hébergés par 4 dans des compartiments de 1820 cm², selon les normes d'hébergement détaillées dans 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 (5 études chez le rat + 15 études chez la souris), incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total (450 rats au maximum et 1350 souris au maximum).

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'analyser la pharmacocinétique et de vérifier l'innocuité de nouvelles molécules thérapeutiques. 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'efficacité et la vérification de l'innocuité d'un candidat médicament 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.

17100 La thérapie par photobiomodulation (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

Le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) tel que nous l'observons dans le cadre du SARS CoV 2 est lié à une exacerbation du système inflammatoire pulmonaire survenant entre le 7ème et le 14ème jour. Certains patients présentent un très faible degré d'oxygénation sanguine (hypoxémie profonde) entraînant une insuffisance respiratoire.

L'objectif de notre dispositif médical est de traiter l'hypoxie pulmonaire par la PhotoBioModulation (PBM) dont le principe est d'augmenter l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène.

La PBMT n'étant pas applicable de façon externe sur l'ensemble du volume pulmonaire, nous envisageons d'utiliser notre dispositif médical par voie intravasculaire en irradiant la masse sanguine dans les artères pulmonaires dans un modèle de porc hypoxique. Ce modèle animal présente des caractéristiques anatomiques et physiologiques proches de celles de l'Homme.

Notre dispositif médical a fait l'objet de travaux antérieurs sur un modèle d'embryon de poulet et nécessite aujourd'hui une validation chez le porc avant un essai chez l'homme.

L'objectif de cette étude en phase aiguë (évaluation préclinique sur porc de taille réduite) est de fournir un niveau de preuves sur la faisabilité, la sécurité et la performance de notre dispositif médical. Les dommages éventuels attendus pour l'animal seraient une lésion vasculaire lors de la mise en place des fibres optiques et lors du traitement par PBM.

Sur la base des résultats obtenus et dans les circonstances de non risques potentiels, des essais chez l'Homme pourront être proposés.

Le nombre total d'animaux envisagé est de 12 porcs.

Règle des 3R : Réduction- Le nombre total d'animaux a été réduit à 12 individus pour ces essais en phase aiguë ; cet effectif est le minimum envisageable pour détecter des anomalies ou des événements indésirables majeurs avant une demande d'approbation d'un essai d'implantation chez l'Homme.

Raffinement- Pour réduire le mal être de l'animal à tous les stades de nos interventions:

- nous utilisons les techniques mini-invasives pour la pose des cathéters artériels et veineux (méthode de Seldinger)

- 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...).

- L'anesthésie générale de l'animal sera suivie par le monitoring en continu des paramètres suivants : électrocardiogramme, pressions artérielles, fréquence cardiaque, saturation en oxygène, fraction expirée en CO₂,

- Pour la mise à mort, l'animal est toujours préalablement anesthésié avant induction d'une surcharge anesthésique.

Remplacement- Les effets de la PBM ont été testés au préalable sur des cellules cardiaques en cultures et sur des embryons de poulet.

Le modèle préclinique (utilisation animaux) est obligatoire avant le passage chez l'homme.

17101 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...). Cette caractérisation ne peut être réalisée avec pertinence qu'à partir de tissus dont le développement est assuré *in vivo*. En effet, 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 termes d'amélioration de la santé des nouveau-nés.

Afin de déterminer précisément le stade de gestation et par conséquent le stade de développement des agneaux, une synchronisation du cycle sexuel sera effectuée avant l'accouplement. Les brebis gravides seront suivies par échographie pour confirmer le statut gestationnel. En fin de gestation (120 à 140 jours), une césarienne sera réalisée de façon à accéder à l'agneau in utero. Les vaisseaux ombilicaux seront alors cathétérisés et la circulation fœtale sera redirigée vers une plateforme d'oxygénation extracorporelle (ECMO). L'agneau sera alors transféré dans une poche amniotique pour y terminer son développement. Une fois ce développement terminé, les agneaux seront mis à mort et différents tissus (poumons, cerveau, surrénales, tractus digestif, foie, rate, rétine) seront prélevés pour mener les analyses d'expression moléculaire et cellulaire de marqueurs du développement.

L'objectif à terme de l'étude est la mise au point d'un système de développement fœtal extracorporel pour assurer la prise en charge de l'extrême prématurité. Le projet présent concerne la mise au point technique (courbe d'apprentissage) de ce modèle de développement fœtal extra-utérin, chez des agneaux en fin de gestation (120 à 140 jours), maintenus quelques heures à quelques jours dans le dispositif avant leur mise à mort. Cette courbe d'apprentissage durera 12 mois et sera réalisée à partir de 10 brebis adultes gravides, effectif nécessaire pour obtenir 10 agneaux. A l'issue de l'intervention, les brebis seront réveillées, suivies cliniquement pour assurer leur récupération post-opératoire. Un habitat adapté et enrichi sera mis en place, en limitant l'isolement des brebis à 5 jours après chaque chirurgie et en leur permettant de voir et d'entendre les autres brebis pendant cette période. Enfin, les brebis seront replacées dans le circuit de l'élevage ovin afin de poursuivre leur carrière.

17102 Les maladies du système musculosquelettique touchent une large proportion de la population, que ce soient des maladies génétiques affectant le développement et la croissance osseuse, les cancers, les maladies dégénératives liées au vieillissement telles que l'ostéoporose et l'arthrose ou encore les défauts de régénération suite à un traumatisme. Les traitements actuels des non-consolidations et des

grands défauts osseux sont la chirurgie et l'autogreffe osseuse. La thérapie cellulaire est actuellement envisagée et repose sur l'utilisation de cellules souches squelettiques dérivées de la moelle osseuse. Nos recherches visent à mieux comprendre le processus de formation et de régénération osseuse afin de mettre au point de nouvelles applications thérapeutiques cellulaires et pharmacologiques. Le but de nos projets est d'identifier les sources de cellules souches participant à la formation et la réparation osseuse, et grâce au développement de marqueurs génétiques chez la souris, de déterminer les mécanismes de recrutement et de différenciation des cellules souches osseuses pendant le développement et la régénération tissulaire normale ou pathologique.

La réparation osseuse a lieu dans un environnement tissulaire complexe impliquant des interactions entre l'os, les vaisseaux, les nerfs, les cellules inflammatoires, les tissus adjacents à l'os tel que le muscle. Expérimentalement, il n'est pas possible de reproduire la complexité de cet environnement dans un système cellulaire *in vitro* ou par modélisation mathématique. C'est pourquoi nous utilisons des modèles animaux nécessaires à la compréhension des mécanismes de la régénération osseuse *in vivo*. Les études *in vivo* pourront constituer un ensemble de données précliniques pour de futures applications thérapeutiques.

Des modèles de souris génétiquement modifiées sont employés ainsi que des procédures de blessures osseuses (fractures du tibia), de greffes de cellules et tissus, d'injections de substances, et d'imagerie. Le processus de régénération osseuse est spontané. Le cal (zone de régénération) se forme en une semaine et stabilise la fracture. Les animaux sont guéris après 3 semaines lorsque le cal est entièrement ossifié. Toutes nos expérimentations sont pratiquées sous anesthésie accompagnée d'une analgésie. Les animaux reçoivent 3 doses d'analgésique après opération, et sont suivis jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les méthodes d'enrichissement sont mises en œuvre par les équipes d'animaliers responsables du bien être animal (maison en carton, matériel de nesting).

Compte tenu de l'état actuel de nos connaissances sur le rôle des cellules souches osseuses et les différentes voies de signalisation impliquées dans la régénération osseuse, nous avons établi le nombre exact de groupes expérimentaux et d'échantillons nécessaires pour atteindre nos objectifs tout en respectant la règle des trois R. Nos études antérieures nous permettent de définir précisément le nombre minimum d'animaux (=1280) nécessaires aux tests statistiques requis, tout en limitant le nombre total d'animaux, en réduisant les temps de prélèvements et en regroupant les animaux contrôles.

17103 Les maladies du système musculosquelettique touchent une large proportion de la population, que ce soient des maladies génétiques affectant le développement et la croissance osseuse, les cancers, les maladies dégénératives liées au vieillissement telles que l'ostéoporose et l'arthrose ou encore les défauts de régénération suite à un traumatisme. Les traitements actuels des non-consolidations et des grands défauts osseux sont la chirurgie et l'autogreffe osseuse. La thérapie cellulaire est actuellement envisagée et repose sur l'utilisation de cellules souches squelettiques dérivées de la moelle osseuse. Nos recherches visent à mieux comprendre le processus de formation et de régénération osseuse afin de mettre au point de nouvelles applications thérapeutiques cellulaires et pharmacologiques. Le but de nos projets est d'identifier les sources de cellules souches participant à la formation et la réparation osseuse, et grâce au développement de marqueurs génétiques chez la souris, de déterminer les mécanismes de recrutement et de différenciation des cellules souches osseuses pendant le développement et la régénération tissulaire normale ou pathologique.

La réparation osseuse a lieu dans un environnement tissulaire complexe impliquant des interactions entre l'os, les vaisseaux, les nerfs, les cellules inflammatoires, les tissus adjacents à l'os tel que le muscle. Expérimentalement, il n'est pas possible de reproduire la complexité de cet environnement dans un système cellulaire *in vitro* ou par modélisation mathématique. C'est pourquoi nous utilisons des modèles animaux nécessaires à la compréhension des mécanismes de la régénération osseuse *in vivo*. Les études *in vivo* pourront constituer un ensemble de données précliniques pour de futures applications thérapeutiques.

Des modèles de souris génétiquement modifiées sont employés ainsi que des procédures de blessures osseuses (fractures du tibia), de greffes de cellules et tissus, d'injections de substances, et d'imagerie. Le processus de régénération osseuse est spontané. Le cal (zone de régénération) se forme en une

semaine et stabilise la fracture. Les animaux sont guéris après 3 semaines lorsque le cal est entièrement ossifié. Toutes nos expérimentations sont pratiquées sous anesthésie accompagnée d'une analgésie. Les animaux reçoivent 3 doses d'analgésique après opération, et sont suivis jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les méthodes d'enrichissement sont mises en œuvre par les équipes d'animaliers responsables du bien-être animal (maison en carton, matériel de nesting).

Compte tenu de l'état actuel de nos connaissances sur le rôle des cellules souches osseuses et les différentes voies de signalisation impliquées dans la régénération osseuse, nous avons établi le nombre exact de groupes expérimentaux et d'échantillons nécessaires pour atteindre nos objectifs tout en respectant la règle des trois R. Nos études antérieures nous permettent de définir précisément le nombre minimum d'animaux (=1280) nécessaires aux tests statistiques requis, tout en limitant le nombre total d'animaux, en réduisant les temps de prélèvements et en regroupant les animaux contrôles.

17104 Les muscles squelettiques sont essentiels à la locomotion, à la thermorégulation et aux activités sédentaires vitales, comme la respiration et la déglutition. Plusieurs maladies musculaires (appelées myopathies) restent incurables entraînant une destruction des cellules musculaires, les myofibrilles.

Les cellules souches musculaires offrent une voie thérapeutique très prometteuse en raison de leur extraordinaire potentiel de régénération et réparation des muscles. Afin d'utiliser de ces cellules pour la thérapie des maladies musculaires, il faut d'abord identifier des facteurs qui assurent le bon fonctionnement des cellules souches musculaires. Nous disposons maintenant d'outils moléculaires puissants permettant la création de modèles animaux chez la souris afin d'identifier de tels facteurs qui peuvent devenir des cibles thérapeutiques.

Dans le domaine du muscle, il existe plusieurs modèles animaux permettant de supprimer les facteurs d'intérêt dans les cellules souches musculaires et d'analyser l'importance de ces facteurs. Cependant ces modèles n'ont jamais été comparés entre eux dans une même étude, même si l'on soupçonne que l'un d'entre eux n'est pas approprié. Nous axerons notre étude sur la caractérisation et la comparaison des modèles les plus utilisés à l'échelle mondiale, dont le modèle prétendument inapproprié, et nous n'inclurons pas tous les modèles disponibles (règle des 3R-réduction). Les principales approches mises en œuvre dans notre laboratoire pour permettre cette comparaison englobent un large éventail de techniques en biologie moléculaire et cellulaire. Notre objectif principal est donc d'identifier le modèle de souris le plus pertinent afin de i) faciliter l'accélération du développement des thérapies et ii) diminuer l'expérimentation animale inutile et contraire à l'éthique sur des modèles inappropriés.

Cette étude utilisera un maximum de 540 animaux réparties sur 3 procédures expérimentales. Tout au long de nos procédures, la règle des 3R sera respectée :

1) Quand l'observation le permet, une approche préalable de remplacement par l'utilisation de cultures cellulaires est employée, ce qui permet par la suite de réduire le nombre d'expériences incontournables réalisées sur l'animal. Bien que plusieurs équipes, dont la nôtre, développent des approches *in vitro* pour générer et étudier des cellules souches musculaires, l'efficacité est encore faible et les cellules présentent des différences significatives par rapport à leurs homologues *in vivo*. Par conséquent, nous utilisons ici une approche génétique qui permet la manipulation des voies de signalisation directement dans l'environnement physiologique des cellules, c'est-à-dire dans les muscles.

2) Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaires pour avoir une bonne puissance de l'étude et des réponses aux questions posées. En effet, les protocoles expérimentaux chez la souris sont établis afin de pouvoir minimiser le nombre d'animaux soumis à expérimentation tout en conservant une masse suffisante pour assurer la reproductibilité et la cohérence statistique des observations, en s'efforçant d'utiliser tous les animaux issus des croisements, si possible. De plus, nous limiterons notre analyse aux modèles les plus couramment utilisés par la communauté scientifique, en excluant les autres modèles disponibles.

3) Ces modèles seront d'abord étudiés dans le contexte du muscle sain avant d'étudier le muscle blessé. Après les actes chirurgicaux potentiellement douloureux, les animaux sont suivis quotidiennement et une prévention de la douleur est assurée par un traitement analgésique approprié. 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 (par exemple perte de poids, souffrance, apathie, déshydratation des animaux) conduira à l'interruption de la procédure.

17105 L'épidémie de COVID-19 est considérée comme une urgence de santé publique de portée internationale par l'Organisation Mondiale de la Santé. Même si la COVID-19 est une maladie bénigne chez la plupart des sujets, 14% des patients présentent des symptômes respiratoires, parmi lesquels 5% développent un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) avec un risque élevé de décès. Bien que les stratégies de lutte contre le virus ou de prévention de la maladie soient d'une importance capitale, une meilleure compréhension de la physiopathologie de la COVID-19 est nécessaire pour améliorer la prise en charge et le traitement des patients, en particulier ceux souffrant d'un syndrome respiratoire ; aucun traitement spécifique n'est actuellement disponible.

Des études récentes basées sur des données cliniques et expérimentales ont rapporté que le syndrome de détresse respiratoire aiguë, résulte de l'incapacité de l'organisme à neutraliser des molécules dites « de danger », naturellement produites par l'organisme. Elles sont à l'origine d'une cascade inflammatoire très destructrice pour certains tissus et particulièrement les poumons dans le cas du SDRA. Ces molécules du soi, sont détectées et considérées par le système immunitaire comme des « microbes », et induisent une inflammation massive.

Il a été démontré que le ciblage de ces molécules pro-inflammatoires, produites par des cellules de l'immunité innée, que sont les polynucléaires neutrophiles, améliore considérablement l'atteinte tissulaire dans des modèles murins de SDRA.

Les études nécropsiques réalisées chez les patients décédés en réanimation de la COVID-19, confirment une implication des polynucléaires neutrophiles, et une dysfonction de l'endothélium vasculaire à l'origine des lésions pulmonaires.

De manière intéressante, la COVID-19 s'associe à des formes de vascularite cutanée isolée, ou bien systémique notamment chez l'enfant (maladie de Kawasaki). Ces observations suggèrent une potentielle parenté physiopathologique entre la COVID-19 et le groupe des vascularites.

Les vascularites sont des maladies auto-immunes caractérisées par une inflammation de l'endothélium et une implication des polynucléaires à l'origine de ces lésions. Sur le plan clinique, les vascularites, sont des maladies, pouvant potentiellement atteindre tous les organes, mais un syndrome pneumo-rénal en fait toute la gravité en entraînant une détresse respiratoire aiguë et une insuffisance rénale pouvant entraîner une prise en charge des patients en service de réanimation.

Dans un modèle murin de vascularite, notre équipe a pu démontrer qu'une molécule naturellement produite par l'organisme, le FASL soluble, était capable de favoriser la migration au sein des tissus inflammatoires, de différentes cellules immunitaires, dont les polynucléaires neutrophiles.

Le blocage du FASL soluble par un peptide thérapeutique, préalablement approuvé *in vitro*, améliore les paramètres cliniques et biologiques, dans ce modèle de vascularite et dans plusieurs modèles murins de lupus.

De manière intéressante, le FASL soluble est élevé chez les patients atteints de la COVID-19, et semblerait impliqué dans le SDRA.

Nous souhaitons donc étudier le blocage du FASL soluble, dans un modèle murin de SDRA.

Afin de réaliser l'ensemble de nos expériences, 300 souris sont demandées sur une période de 3 ans, dans le respect de la règle 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 de ce projet. Mais seul un modèle murin permettra de caractériser la fonction et les mécanismes d'action dans sa globalité de ce peptide thérapeutique, de vérifier son innocuité, et son efficacité thérapeutique potentielle dans différents modèles murins de maladies inflammatoires.

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. 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 de leur naissance à leur mort. Ils seront hébergés en cages collectives, qui seront enrichies avec du matériel pour nidifier, dans le but de rétablir le répertoire comportemental des souris.

Les animaux seront suivis quotidiennement par le personnel de l'animalerie et les manipulateurs. Des points limites précoces et adaptés seront appliqués.

Pour l'induction du syndrome de détresse respiratoire aiguë 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).

Nous n'utiliserons pas d'analgésiques. En effet, le SDRA n'est pas douloureux car le poumon n'est pas un organe nociceptif. Les animaux seront gardés en vie au maximum 48h après l'induction du SDRA. En effet, nous ne souhaitons pas observer la fibrose pulmonaire décrite dans la littérature scientifique 5 semaines après l'induction du SDRA.

17106 Le complexe respiratoire porcin (CRP) constitue l'une des maladies les plus fréquentes affectant les porcs élevés en grandes collectivités dans des bâtiments. *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), agent étiologique primaire de la pneumonie enzootique, et les virus influenza A porcins (swIAV), responsables en élevage de la grippe, constituent deux des principaux agents infectieux impliqués dans le déterminisme des maladies pulmonaires des porcs élevés en bâtiment fermé. En raison de la prédilection de ces agents pathogènes pour l'appareil respiratoire, l'exposition de porcs sensibles à des aérosols infectieux générés par des porcs infectés est une voie privilégiée d'infection. Différentes publications ont montré que *M. hyopneumoniae* et les swIAV peuvent être détectés dans l'air. L'infection par voie aéroportée d'un porc sensible sous-tend la viabilité des particules infectieuses dans l'air. Toutefois, peu de données sont disponibles sur la capacité à isoler *M. hyopneumoniae* ou les swIAV à partir de prélèvements de bioaérosols générés par les porcs. Par ailleurs, la cinétique de détection de ces agents infectieux dans l'air environnant de porcs excréteurs reste mal connue à ce jour, notamment dans le cadre d'infections mixtes fréquemment rencontrées en élevage. Ces données permettraient de mieux appréhender le niveau d'exposition à ces agents infectieux par la voie aéroportée au cours d'infections mixtes. In fine, elles permettraient de concevoir et de mettre en œuvre des moyens de prévention adaptés aux conditions d'élevage pour réduire les possibilités d'infection par voie aéroportée et ainsi améliorer la santé et le niveau de bien-être des animaux. En élevage, des systèmes de traitement de l'air ont été développés pour prévenir les possibilités de transmission par voie aéroportée. Ils reposent actuellement essentiellement sur la filtration mécanique de l'air entrant dans les salles d'élevage. Les dispositifs de filtration sont préférentiellement mis en place dans des élevages à haut statut sanitaire. Le coût associé à ces installations et à leur maintenance freine leur développement en élevage de production où sévit majoritairement le CRP. Un dispositif innovant de traitement de l'air fondé sur le principe de la photonique a été développé pour des applications en élevage. Le principal avantage du dispositif réside dans le faible niveau de maintenance rendant l'appareil potentiellement économiquement compétitif face à des systèmes de filtration plus classique. Toutefois, les données quantitatives manquent pour évaluer l'effet de ce système sur la transmission par voie aéroportée d'agents infectieux clés du CRP. L'expérimentation a donc principalement pour but d'évaluer l'effet de ce dispositif de traitement de l'air sur la transmission de *M. hyopneumoniae* et/ou d'un swIAV via les bioaérosols générés par des porcs inoculés en conditions contrôlées. Elle permettra également d'étudier la cinétique de transmission par voie aéroportée de *M. hyopneumoniae* seul pendant 3 semaines post-inoculation, et celle de *M. hyopneumoniae* et d'un swIAV ensemble, entre des porcs co-infectés et des porcs sentinelles (non inoculés et sensibles), pendant 6 semaines. Ce projet impliquera 40 porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS). Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de l'éthique et du bien-être des animaux, en particulier le nombre d'animaux utilisés sera le plus faible

possible tout en permettant l'estimation de l'effet du système de traitement de l'air sur la transmission par voie aéroportée et l'obtention de paramètres de transmission précis. 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. Hormis une hyperthermie et une baisse d'appétit temporaires et une légère toux, il n'est pas attendu de symptomatologie sévère lors de cette expérimentation. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les porcs seront mis à mort afin qu'ils ne souffrent pas. L'expérimentation consistant en une étude de transmission, il n'y a aucune possibilité de remplacement du modèle animal par une étude *in vitro*.

17107 Les antiparasitaires sont des traitements indispensables pour les animaux de compagnie afin de leur éviter des infestations par des parasites aussi bien externes (puces, tiques...) qu'internes (vers). En effet, ces parasites peuvent causer aux animaux infestés des désagréments mineurs comme parfois des maladies graves et également des zoonoses (maladies transmises à l'homme). Les produits antiparasitaires peuvent être appliqués par voie orale (comprimés ou formes liquides), injectables ou par voie externe soit sous forme liquide (shampooing ou solution liquide mis sur la peau, on parle d'application topique), soit par l'intermédiaire d'un collier antiparasitaire.

Dans le cas des antiparasitaires externes, ces animaux de compagnie étant en contact étroit avec l'homme, il est nécessaire d'étudier l'exposition des propriétaires à ces médicaments en particulier lorsqu'ils caressent l'animal dans le but d'évaluer tous risques d'intoxication (passage à travers la peau, absorption orale lorsqu'un particulier met ses mains à la bouche...)

Le but de ce projet sera d'évaluer la quantité de produit qui pourrait être transféré de l'animal à l'homme au cours du temps après application d'un nouvel antiparasitaire externe chez le chien. Ce projet ne comporte qu'une seule procédure expérimentale de classe de sévérité modérée (lié aux conditions d'hébergement). Cet antiparasitaire sera appliqué au contact de la peau sur la ligne du dos 4 fois à une semaine d'intervalle sur 6 chiens mâles adultes. Chaque chien sera ensuite caressé à différents intervalles de temps et jusqu'à 28 jours après la dernière application par un opérateur équipé de gants selon une procédure bien définie. La quantité de produit présent sur les gants sera ensuite déterminée afin d'évaluer cette exposition.

Ce test est défini dans une ligne directrice européenne et répond à l'obligation d'évaluer la sécurité des médicaments vétérinaires pour l'animal et les utilisateurs du produit avant leur mise sur le marché. Aucune méthode alternative ne permet à l'heure actuelle de remplacer ce test sur l'animal. Le nombre d'animaux prévu pour ce projet a été déterminé en fonction de la variabilité des résultats attendu et des recommandations de la ligne directrice.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés individuellement pour éviter toute contamination croisée pouvant fausser les résultats. Les boxes des animaux seront séparés par des parois en plexiglass sur une certaine hauteur afin d'éviter tout contact physique direct mais en favorisant les autres sens. Un enrichissement du milieu adapté (présence de jouets, de tablettes) et des interactions renforcées avec les soigneurs seront mis en place pour éviter l'ennui. Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress. A la fin de ce projet, les animaux ne seront pas euthanasiés et pourront être utilisés pour un autre projet après accord du vétérinaire désigné.

17108 La chondrodysplasie (provoque du nanisme) et la craniosténose (provoque des fusions prématures des sutures de la boîte crânienne) sont des pathologies osseuses rares dont la fréquence est de 1/15 000 et qui sont en partie dues à des mutations « gain de fonction » dans le gène de la famille des « récepteurs des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFRs) » qui perturbent la formation du squelette et qui sont responsables notamment des anomalies de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse. De plus ces deux pathologies sont associées à des problèmes neurologiques et psychiatriques (problème de mémoire, dépression et anxiété). Les récepteurs responsables sont exprimés un peu partout dans le cerveau. Chez l'humain, la chondrodysplasie et la craniosténose ont été caractérisées par des troubles du comportement tel que la dépression, des problèmes de mémoire et des troubles de la concentration. Par conséquent, une meilleure compréhension du rôle des FGFRs

dans le cerveau et l'identification des mécanismes cellulaires permettant le maintien de nos fonctions mentales, pourraient conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans les troubles de comportement (mémoire, stress et anxiété) chez les patients atteints d'ostéochondrodysplasie porteurs de mutations *Fgfr3*, nous utiliserons un modèle de chondrodysplasies et un modèle de craniosténoses chez la souris. Nous confirmerons tout d'abord que nos modèles (gain de fonction de FGFR3) reproduisent les phénotypes observés chez l'homme au niveau du comportement, puis on inhibera la voie FGFR3 pour bloquer ces effets dans le but de proposer une solution thérapeutique.

Les expérimentations *in vitro* peuvent nous apporter des informations mais il est cependant nécessaire et indispensable de valider notre hypothèse concernant l'impact des mutations FGFR3 gain de fonction sur le comportement avec l'expérimentation animale. 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 3 mois pour vérifier notre hypothèse, le nombre de souris nécessaire sera de 680 sur 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées sera réduit à son minimum en utilisant des tests statistiques adaptés. L'inhibition de la voie FGFR3 sera faite par injection dans le ventricule cérébral ou systémique chez les souris avant de les soumettre à différents tests comportementaux. La chirurgie aura lieu sous anesthésie générale pour éviter toute douleur et des antalgiques sont prévus en pré- et post-opératoire. Pour assurer le bien-être des souris, elles bénéficieront de coton et de « maisons » en carton 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 des FGFR dans le cerveau et conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour restaurer/prévenir les effets délétères des pathologies de la chondrodysplasie et la craniosténose.

17109 Ce projet vise à déterminer si de fortes intensités lumineuses peuvent affecter le développement et la croissance de la Seiche, *Sepia officinalis*, une espèce aquatique d'intérêt écologique et économique. Les céphalopodes ont des yeux performants et un cerveau complexe. Les hautes intensités lumineuses en affectant le développement des yeux et/ou du système nerveux peuvent perturber le comportement. Les œufs de la seiche sont noirs car la capsule qui entoure l'embryon est imprégnée de mélanine, ce qui protégerait l'embryon de la lumière au début du développement. Le projet consiste à tester

1) Phase 1 (2021): Le rôle de la capsule en appliquant un éclairage « de jour » sur deux séries d'œufs : des œufs avec capsule (Série Capsule- SC), et des œufs sur lesquels la capsule est retirée (Série Décapsulée-SD) à un stade à partir duquel les embryons se développent normalement ; la membrane protectrice transparente autour de l'embryon est laissée, l'environnement n'est ainsi pas modifié.

2) Phase 2 (2023): Le rôle de la lumière en appliquant trois quantités d'éclairage sur des œufs avec capsule : normale, haute et très haute sous éclairage LED. Ces éclairages seront définis par rapport aux résultats de la phase 1. Ces éclairages seront testés sur les œufs (embryons) et après éclosion sur des juvéniles jusqu'à 2 mois.

Cette étude permettra d'évaluer les conséquences d'une augmentation de l'éclairage et le rôle de la capsule. Pour les deux phases il s'agira 1) de mesurer quantitativement la neurogenèse 2) de déterminer l'expression de gènes impliqués dans la photosensibilité. Pour atteindre ces objectifs, les embryons et les juvéniles seront euthanasiés, fixés et des organes prélevés.

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 de céphalopodes. Nous nous basons sur des publications répertoriant les conditions environnementales optimales pour le bien-être animal, et mentionnant des indicateurs de stress potentiel. Pour chaque phase, trois femelles et trois mâles adultes seront pêchés lors du retour

des animaux sur les côtes et acclimatés au sein de 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 avec de la nourriture vivante (crabes verts, crevettes...). Les mâles et femelles en présence vont s'apparier naturellement puis s'isoler du reste des animaux. Dès qu'un couple est constitué, il est transféré dans un bac de reproduction (bac cubique avec couvercle de 500L en circuit ouvert) où sont fournis de nombreuses caches et supports de pontes différents. Les femelles pondent entre 400 et 1000 œufs sur la saison. L'incertitude sur le nombre d'œufs pondus impose de prévoir 3 couples reproducteurs par phase, soit 12 géniteurs adultes.

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. Mâles et femelles meurent après la ponte en condition naturelle, en conséquence, les géniteurs ayant pondu seront anesthésiés puis euthanasiés.

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 œufs seront prélevés dans chaque aquarium avant éclosion à 6 stades de développement et après éclosion à 1 semaine pour les deux phases expérimentales et pour la phase 2 en plus à 2 et 3 semaines, 1 et 2 mois après éclosion. Le nombre d'embryons ou juvéniles nécessaires est de 25 à chaque stade (vérifié par l'ouverture de trois œufs), pour chaque série (SC et SD de la phase 1, trois éclaircissements de la phase 2). Le nombre total d'embryons et juvéniles sera de 150 et 25 respectivement par série pour la phase 1, et de 150 et 125 respectivement par série pour la phase 2. Ce nombre tient compte des nécessaires répliques. Il faut prévoir en plus 3 œufs par stade pour vérification des stades pour chaque série et chaque phase et les 10% d'œufs naturellement non fécondés. Le nombre d'œufs mis en incubation est a minima de 210 œufs pour SC et 210 pour SD, soit 420 œufs pour la phase 1, et 310 œufs pour chacun des éclaircissements, soit 930 œufs pour la phase 2. Le total sur les deux phases est donc de 1350 œufs. Pour assurer ce nombre, 3 couples de géniteurs sont prévus pour chaque phase, soit 12 adultes. Le nombre total d'animaux impliqués est donc de 1362. Dans le cas où tous les œufs auraient été fécondés, les juvéniles surnuméraires seront conservés pour effectuer une étude comportementale.

Trois procédures sont prévues : l'euthanasie des adultes/juvéniles de seiches, l'application des intensités lumineuses aux embryons/juvéniles (le seuil haut de tolérance sans conséquences sur l'organisme n'est pas connu), et l'étude comportementale des juvéniles. Cette étude respecte la règle des 3R.

- Remplacement : l'expérimentation envisagée nécessite l'organisme dans son entier et les structures impliquées dans la fonction visuelle et les capacités cognitives. Les céphalopodes possédant des structures cérébrales et visuelles 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.

17110 La ricine est une protéine d'origine végétale qui est au cœur des efforts dans la lutte contre le risque de bioterrorisme. Parmi les modes de dissémination de cette toxine, la voie aérosol est la plus préoccupante. Toutefois, aucune solution thérapeutique anti-ricine n'a à ce jour été testée et validée en France. Disposer d'une telle validation de contre-mesures constituerait une avancée majeure au regard de la menace terroriste que constitue la ricine pour les populations civiles, de défense, et de sûreté/sécurité.

Le primate non humain (PNH) a été choisi pour ce projet. Il constitue en effet un modèle d'exposition du tractus respiratoire bien maîtrisé car anatomiquement comparable à celui l'homme. Il fournit

également une réponse moléculaire, biologique et clinique quantifiable à l'aide d'outils transposables immédiatement chez l'Homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 152 animaux nés et élevés en captivité et provenant d'élevages agréés, sur une durée de 5 ans (soit en moyenne 30 animaux par an). Afin de réduire ce nombre à un minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour l'interprétation des résultats, les animaux seront au préalable exposés à un placebo (groupe contrôle) puis seront ensuite exposés à la toxine. Ces animaux seront répartis dans 2 protocoles. Le premier consiste à finaliser la mise en place d'un modèle macaque opérationnel d'intoxination par la ricine. L'intoxination désigne l'état dans lequel se trouve un organisme après ingestion, inhalation ou absorption de toxines. Le second protocole, consiste à utiliser le modèle d'intoxination pour tester l'efficacité thérapeutique de contre-mesures protéiques (anticorps) et/ou chimique.

Les méthodes expérimentales ont été conçues de façon à éviter toute souffrance lors des interventions (prélèvements de sang, intoxication expérimentale) sur les animaux : elles seront réalisées sous anesthésie générale, et les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum pour obtenir des résultats fiables. L'imagerie *in vivo* sera utilisée pour raffiner les méthodes expérimentales.

Une attention particulière sera apportée à l'hébergement des animaux en groupe. Des critères d'arrêt, basés sur l'observation de signes cliniques d'intoxication, sont prévus afin de prendre en compte les effets éventuels liés à l'intoxication. Dans ce cas, le vétérinaire en charge de l'installation sera sollicité afin de prescrire un traitement approprié. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

17111 L'accident vasculaire cérébral (AVC) de type ischémique résulte d'une occlusion transitoire ou permanente d'une artère cérébrale. Ceci entraîne très rapidement une mort neuronale massive. Selon l'organisation mondiale de la santé, l'AVC représente la deuxième cause de mortalité au niveau mondial. De plus, l'impact socio-économique de cette pathologie est très important car en l'absence de traitement efficace, la majeure partie des patients qui survivent à la phase aiguë de l'ischémie, reste handicapée. Aujourd'hui, l'administration de tPA (activateur tissulaire du plasminogène) et la thrombectomie pour restaurer la perfusion sanguine cérébrale sont les seules approches thérapeutiques disponibles. Ces traitements ciblant la phase aiguë visent à protéger les cellules nerveuses et diminuer leur mort. Leurs fenêtres thérapeutiques actuelles sont assez étroites (4 à 6 h). Il apparaît donc indispensable de trouver une molécule permettant d'élargir cette fenêtre thérapeutique.

Les études conduites au sein de notre équipe ont démontré qu'un neuropeptide, le PACAP a un effet neuroprotecteur durant la phase aiguë de l'ischémie cérébrale. Son injection, après un AVC, permet une réduction significative de la zone infarctée chez la souris. Dans ce projet, nous allons réaliser des études sur un modèle murin qui auront pour but d'éclaircir les mécanismes par lesquels ce peptide exerce son effet neuroprotecteur. L'objectif final étant de transformer ce peptide en un médicament pour accroître la fenêtre thérapeutique des approches médicamenteuses actuelles de reperfusion.

Ce projet prend en compte le bien-être de l'animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal. Toutes nos procédures seront réalisées sous anesthésie générale associée à un analgésique permettant de réduire au maximum 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 pendant les actes chirurgicaux. Nous utiliserons la souris comme modèle car de nombreuses études publiées ont déjà modélisé cette maladie chez la souris. De surcroît, à cause des mécanismes physiopathologiques complexes mis en place lors d'une ischémie, les approches *in vitro* ne permettent pas d'étudier cette maladie de manière pertinente. Un total de 328 souris adultes sera utilisé.

Mots clefs : PACAP, ischémie cérébrale, fenêtre thérapeutique, neuroprotecteur.

17112 Les épilepsies partielles ou focales sont souvent associées à un événement déclenchant, tel que la fièvre, un traumatisme grave ou une infection cérébrale, qui mène, après un délai parfois long à l'émergence d'un cerveau épileptique. L'épilepsie du lobe temporal mésial (MTLE) est la forme la plus commune d'épilepsie réfractaire aux traitements. La plupart des caractéristiques morphologiques et

électrophysiologiques de la MTLE peuvent être reproduites chez la souris par l'injection cérébrale de kaïnate au niveau de l'hippocampe. La compréhension des mécanismes pathologiques sous-tendant certaines formes d'épilepsies est importante en raison de la résistance médicamenteuse élevée chez les patients.

L'objectif de ce projet est d'évaluer si la connectivité fonctionnelle est modifiée chez des souris rendues épileptiques après injection cérébrale de kaïnate. Le cerveau est organisé en réseau, avec une connectivité fonctionnelle propre, susceptible d'être modifiée par des états pathologiques comme l'épilepsie. L'étude de ces réseaux se fait par imagerie fonctionnelle en mesurant les modifications du flux sanguin entre différentes zones cérébrales. Nous utiliserons une technique d'imagerie par échographie ultrarapide, qui permet l'étude de la connectivité fonctionnelle chez la souris éveillée. L'utilisation d'un modèle animal est une nécessité car il n'y a pas de méthode alternative pour l'étude du cerveau dans sa globalité. Le nombre total de souris nécessaire à la réalisation de ce projet est de 44 pour une durée de 2 ans. Ce nombre est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3Rs et met en jeu des procédures chirurgicales 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.

A terme, ce projet permettra de démontrer si l'épilepsie entraîne une modification de la connectivité fonctionnelle chez la souris.

17113 L'absence de pathogène dans l'élevage de lignées de souris assure le bien-être animal, la qualité de la reproduction et la fiabilité des résultats expérimentaux. L'élimination des agents pathogènes des lignées candidates à l'entrée en zone d'élevage de statut sanitaire très contrôlé est réalisée par transfert aseptique d'œufs fécondés. Cette procédure, appelée « décontamination sanitaire » consiste à accoupler des femelles stimulées par des hormones sexuelles avec les mâles à décontaminer, à récupérer et nettoyer des ovocytes (gamètes femelles), puis de les réimplanter au niveau de l'oviducte d'ovaire de souris « mère porteuses ». Un contrôle sanitaire à 6 semaines des souris nées par ce transfert d'œufs fécondés permettra de vérifier l'absence de pathogènes.

Ainsi, ce projet permet de maintenir les lignées de souris transgéniques à un statut sanitaire exempt d'organismes pathogènes murins.

Ce projet concerne la « décontamination sanitaire » d'environ 20 lignées de souris par transfert aseptique d'œufs fécondés par an.

La technique de transfert aseptique d'œufs fécondés est également utilisée pour revivifier des lignées de souris dont les gamètes (ovocytes ou sperme) ont été préalablement congelés.

Ce projet est réalisé en respectant la règle des 3R.

-Remplacement: Afin de maintenir un statut sanitaire sans pathogène, la décontamination des lignées nécessite l'utilisation d'animaux pour le transfert d'ovocytes. La congélation des gamètes est une méthode permettant de remplacer l'élevage en surnombre d'animaux non utilisés en expérimentation.

-Réduction: le nombre d'animaux utilisé pour la décontamination d'une lignée par transfert aseptique d'œufs fécondés a été optimisé afin d'obtenir les naissances de 10-20 souriceaux en une série de 5 réimplantations. La conservation des gamètes de souris permet de réduire le nombre d'animaux utilisés et assure le statut sanitaire de la lignée.

Les mâles rendus stériles par vasectomie sont utilisés plusieurs fois pour l'obtention des souris « mère porteuses » de l'animalerie. L'induction d'une superovulation chez les femelles permet de réduire le nombre de femelles à utiliser pour obtenir un nombre suffisant d'ovocytes.

-Raffinement: Les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation avec des conditions d'hébergement et un suivi des animaux permettant d'assurer leur bien-être. Les

étapes d'expérimentation seront réalisées dans des conditions permettant de minimiser les douleurs, la souffrance et les angoisses que pourrait ressentir l'animal grâce à l'utilisation d'anesthésie adaptée et d'anti-douleurs.

Au total, ce projet nécessitera au maximum 1360 souris (60 mâles et 1300 souris femelles).

17114 La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative génétique héréditaire caractérisée par l'apparition progressive de symptômes moteurs et cognitifs extrêmement invalidants. Elle apparaît généralement à l'âge adulte, entre 30 et 50 ans. Il y a plus de 6000 patients en France. Cette maladie est due à une mutation affectant le gène HTT, codant pour la protéine huntingtine (htt). Bien que l'expression de cette protéine soit ubiquitaire, la toxicité de la protéine htt mutée affecte majoritairement le striatum, une région cérébrale jouant un rôle central dans le contrôle du mouvement, la mémoire procédurale et les mécanismes d'adaptation cognitive. La maladie s'étend ensuite à d'autres structures du cerveau et les patients décèdent environ 15 ans après le début des symptômes. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant de ralentir l'évolution de cette maladie. Une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques est nécessaire pour trouver des nouvelles cibles thérapeutiques et développer des traitements adaptés.

Selon notre hypothèse de travail, des gènes sélectivement exprimés dans le striatum pourraient être impliqués dans sa vulnérabilité dans un contexte de MH. En partant de cette hypothèse, une analyse transcriptomique à haut débit d'échantillons cérébraux murins et humains nous a amené à étudier plusieurs « marqueurs striataux », protéines spécifiquement exprimées dans le striatum et dont l'expression est réduite dans la MH. La fonction de ces marqueurs striataux reste pour l'heure inconnue. Néanmoins, nos résultats préliminaires indiquent qu'ils protègent contre la toxicité de l'huntingtine mutée.

Ce projet, visant à comprendre quels mécanismes moléculaires expliquent ces effets neuroprotecteurs, fait appel à des modèles rongeurs connus de la MH, ainsi qu'à des modèles rongeurs génétiquement modifiés n'exprimant que l'un des marqueurs striataux d'intérêt. A l'heure actuelle, ce projet ne peut, ni être réalisé à l'aide de modèles cellulaires, ni être simulé par des techniques informatiques. En effet les symptômes neurologiques (moteurs et cognitifs) de la maladie ne peuvent être répliqués que chez l'animal, notamment dans les modèles génétiques murins. Par ailleurs, l'expression des marqueurs striataux d'intérêt est quasi absente dans les modèles de cultures de cellules striatales. Leur expression est détectée principalement dans le cerveau « adulte », totalement « différencié » et requiert toute la complexité des réseaux neuronaux qui se mettent en place au cours de la maturation du cerveau.

Les rongeurs étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés. Les rongeurs après avoir reçu sous anesthésie générale une injection intracérébrale (vecteurs viraux ou perturbateur chimique) seront examinés *in vivo* par des tests comportementaux, par imagerie IRM et spectroscopie RMN non-invasive sous anesthésie. En fin d'expérience, des prélèvements sanguins et de différentes régions cérébrales seront réalisés pour des analyses biochimiques, histologiques et/ou transcriptomiques.

Une simulation statistique précise a été réalisée pour déterminer le nombre minimum d'animaux par groupe, nécessaire pour observer des effets significatifs compte tenu des valeurs attendues. Cette simulation est fondée, d'une part, sur des données obtenues dans la littérature scientifique et, d'autre part, sur les valeurs que nous avons observées dans le passé lors d'expériences utilisant des analyses similaires. Ainsi, nous prévoyons d'utiliser 520 animaux lors des expériences qui seront menées pendant les 5 années de l'étude. Ce nombre maximum (comprenant des groupes témoins de référence) a été déterminé en fonction des expériences à réaliser et des différents groupes expérimentaux requis pour pouvoir répondre à notre question scientifique.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des rongeurs.

17115 Les maladies cardiovasculaires dépendantes des plaquettes sanguines sont fréquentes chez les personnes âgées. Seulement, à part des extrapolations faites à partir de sujets d'âge moyen (40-60 ans), peu de choses sont connues quant aux modifications plaquettaires chez les sujets âgés du fait du développement de maladies chroniques chez ces sujets ou de leur médication qui pourraient indirectement impacter sur les plaquettes sanguines. Il est donc important (i) de mieux comprendre les mécanismes plaquettaires dérégulés dans un contexte de vieillissement et (ii) de trouver de nouvelles cibles pharmacologiques ou de nouveaux biomarqueurs afin de prévenir et de lutter contre les complications cardiovasculaires dues à des modifications plaquettaires chez les patients âgés.

Le nombre de souris estimé pour cette étude sur 5 ans est de 320 animaux maximum avec 2 lignées murines génétiquement modifiées et 7 procédures expérimentales. Les procédures 1, 2 et 3 seront réalisées en premier. Tous les animaux de la procédure 1 et 3 seront soumis à la procédure 4. Les animaux de la procédure 2 seront soumis à la procédure 5. Les procédures 6 et 7 seront réalisées en fonction des résultats obtenus dans les procédures 2, 4 et 5. De la naissance à la mort, les souris sont hébergées et expérimentées selon les conditions de la directive européenne régies par les principes de remplacement, de réduction et de raffinement (Règle des 3 R). Le recours au modèle murin est irremplaçable pour deux raisons majeures: (i) la complexité des mécanismes mis en jeu dans un contexte physiopathologique intégré de vieillissement ne sont pas modélisables par des approches *in vitro* et (ii) l'utilisation des modèles de souris génétiquement modifiées car il n'existe pas à ce jour d'inhibiteurs spécifiques des différentes cibles moléculaires testées. Seulement, le nombre d'animaux sera réduit au maximum (i) en suivant des protocoles expérimentaux établis dans le laboratoire et en tenant compte d'expériences déjà réalisées qui nous ont montré que nous pouvons obtenir des résultats statistiquement corrects en faisant des groupes de 8 souris selon la procédure réalisée, (ii) en limitant aux seules expériences considérées comme absolument indispensables en fonction des résultats obtenus au cours du projet et (iii) en évitant la répétition d'études antérieures. En effet, le nombre de souris sera diminué en fonction des résultats obtenus dans les différentes lignées lors des procédures expérimentales 2, 4 et 5, en ne réalisant pas les procédures expérimentales 6 et 7. De plus, des résultats préliminaires sur 3 animaux nous permettent de définir s'il peut exister des différences statistiquement quantifiables entre les différents groupes, qui si elles existent seront statistiquement affinées avec plus de souris selon la procédure réalisée. L'approche statistique utilisée est 2-Ways-ANOVA suivi d'un post-test sur les moyennes (Bonferroni). Pour le raffinement, les souris ont un accès illimité à la nourriture et boisson avec du papier sopalin, du carton et/ou des cubes de bois dans la cage et une observation quotidienne des souris est réalisée par les zootechniciens. Toutes les procédures expérimentales se feront sous anesthésie et analgésie avec un contrôle permanent de l'état d'anesthésie par les expérimentateurs. Après réalisation des procédures expérimentales sans mise à mort (procédures 1 à 3), les animaux seront observés 2 à 3 fois par jour par les zootechniciens et les expérimentateurs pendant 48h. Une mise à mort rapide de la naissance à la mort ou lors d'une procédure expérimentale sera effectuée si l'animal montre des signes de détresse et souffrance (prostration, perte de poids conséquentes, grosses plaies/blessures) par dislocation cervicale avec anesthésie/analgésie au préalable.

17116 La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative et la première cause de démence chez les personnes âgées. On estime qu'en 2050 elle touchera plus de 106 millions de personnes de par le monde. Son coût socio-économique est proche de 32 milliards d'euros. Malgré des investissements importants des acteurs publics et privés, il n'y a toujours pas, à l'heure actuelle, de solution thérapeutique suffisamment efficace pour ralentir ou traiter la pathologie.

Une des raisons pouvant expliquer le décalage entre résultats de la recherche fondamentale et avancées cliniques vient du fait que, jusqu'à présent, les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer étaient des modèles transgéniques murins reposant sur la sur-expression de formes humaines mutées des protéines APP ou PSEN1 qui jouent un rôle déterminant dans la constitution des plaques amyloïdes. Si ces modèles ont été très utiles pour comprendre les mécanismes d'agrégation des plaques amyloïdes, ils souffrent de défauts importants liés au fait que les protéines transgéniques ne sont pas exprimées à leur niveau normal. En 2014, un nouveau modèle murin de la maladie d'Alzheimer (le modèle APP-NLF) basé sur l'expression d'une forme mutée de la protéine APP humaine exprimée

à des niveaux endogènes a été développé. Bien qu'il ait été reconnu que ce modèle est un modèle murin plus pertinent, il n'a été que partiellement caractérisé d'un point de vue comportemental. Notre objectif est donc de caractériser ce modèle à différents âges de manière à mettre en évidence l'évolution des déficits mnésiques tout en comparant l'effet du sexe sur cette évolution.

384 souris seront utilisées dans ce projet. Pour respecter la règle des 3Rs les mesures suivantes sont prises:

Reduction: une analyse statistique "a priori" a été réalisée pour déterminer le nombre minimal d'animaux à utiliser tout en permettant une analyse statistique correcte des résultats. De plus, les animaux utilisés pour la caractérisation comportementale seront ensuite utilisés pour les analyses biochimiques ou immunohistochimiques.

Raffinement: Les souris seront élevées dans des cages regroupant plusieurs individus de même âge afin de diminuer l'angoisse des animaux. La litière sera enrichie de copeaux mais ne sera pas plus enrichie (cf. maison, roue) car ces enrichissements interfèrent avec les déficits mnésiques que nous souhaitons mesurer. Les souris APP-NLF, y compris les souris APPNL F/NL F, ne présentent pas de phénotype dommageable et ont une espérance de vie similaires aux souris C57BL/6J.

Remplacement: La principale caractéristique clinique de la maladie d'Alzheimer sont les déficits mnésiques. Un modèle pertinent de la pathologie se doit mimer ces déficits qui ne peuvent mesurés que chez des animaux vivants.

17117 La maladie de Parkinson est caractérisée par une perte progressive des neurones dopaminergiques localisés dans la substance noire compacte. Cette maladie est classiquement associée à des symptômes moteurs, cependant il est maintenant reconnu que de nombreux symptômes non moteurs, incluant la douleur, sont très communs. Les symptômes douloureux peuvent être observés chez environ 85 % des patients Parkinsoniens. Cependant il n'y a à ce jour aucune hypothèse pathophysiologique permettant de les expliquer. Une compréhension plus approfondie des mécanismes sous-jacents à ces symptômes devrait faciliter une meilleure prise en charge thérapeutique. Parmi les modèles de rats parkinsoniens disponibles, celui utilisant la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) apparaît être le plus pertinent pour l'étude des troubles nociceptifs. Cependant, ces modèles semblent entraîner des effets variables sur la perception nociceptive des rats. Nous suggérons que cette variété puisse être reliée aux structures dopaminergiques impactées par la lésion. Il est connu que la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson est progressive, démarrant de la substance noire compacte latérale pour s'étendre ensuite sur la totalité de cette structure avant de finalement atteindre l'aire tegmentale ventrale à des stades plus avancés. Il a souvent été suggéré que les symptômes de douleur dans la maladie de Parkinson pourraient représenter un marqueur précoce de la maladie. L'objectif de ce projet est de tester l'impact de la localisation d'une atteinte dopaminergique sur les réponses nociceptives chez le rat. Nous comparerons l'effet de cinq lésions dopaminergiques différentes induites par injection de la toxine 6-OHDA. Les données issues de ce projet apporteront de nouvelles informations pour un meilleur diagnostic du stade d'évaluation de la maladie de Parkinson. En effet, une hyposensibilité indiquerait un stade précoce de dégénérescence dopaminergique, alors qu'une hypersensibilité serait un marqueur de dégénérescence dopaminergique plus large. Combiné à d'autres symptômes prodromaux connus de la maladie de Parkinson, tels que des troubles neuropsychiatrique, troubles du sommeil ou autres symptômes gastriques ou sensoriels, l'augmentation ou la diminution des seuils nociceptifs permettrait également un meilleur affinement du diagnostic Parkinsonien.

Pour assurer la validité statistique des résultats, le projet nécessitera 192 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 signe 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.

17118 Les tumeurs cérébrales sont les tumeurs solides les plus fréquentes de l'enfant et la principale cause de décès par cancer.

Certaines d'entre elles infiltrent le tissu cérébral et sont donc inopérables.

Le seul recours reste la radiothérapie, mais sans bons résultats. De nombreux essais thérapeutiques associant d'autres traitements comme la chimiothérapie n'ont pas permis d'amélioration substantielle. De plus, ces protocoles de radiothérapie sont copiés sur ceux utilisés chez les adultes et ont des effets délétères sur le développement cérébral. Il n'existe actuellement aucun traitement conçu spécifiquement pour les populations pédiatriques.

Afin de pallier à ce manque et d'améliorer le pronostic et la qualité de vie de ces patients, il est nécessaire de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour cela, nous souhaitons développer une approche combinant la radiothérapie et/ou la chimiothérapie à une immunothérapie cellulaire. Cette dernière consiste à prélever puis à réinjecter dans le sang du patient, ses propres cellules immunitaires après les avoir modifiées par thérapie génique pour qu'elles expriment un récepteur chimérique (CAR) afin qu'elles reconnaissent et détruisent les cellules cancéreuses. Ces cellules, nommées lymphocytes CAR, ont montré leur efficacité dans le traitement des leucémies réfractaires à la chimiothérapie, mais elles doivent être optimisées dans le cadre des tumeurs solides afin de prendre en compte le micro-environnement immunosuppresseur de ces tumeurs et l'impact de la radiothérapie et/ou de la chimiothérapie avant la mise en place d'essais cliniques.

Les objectifs du projet seront :

- 1) de déterminer le modèle murin de tumeurs cérébrales pédiatriques le plus pertinent ;
- 2) de tester l'efficacité de la combinaison de la radiothérapie et/ou de la chimiothérapie à des lymphocytes T-CAR anti-ganglioside ;
- 3) d'évaluer la toxicité de ces thérapies.

Afin d'établir les groupes d'expériences et les groupes contrôles, 1510 souris seront nécessaires.

Ce nombre d'animaux prend en compte la règle des 3R.

Il est clairement établi que les cellules tumorales, spécialement celles de glioblastome (GBM), se comportent différemment *in vitro* et *in vivo*, en terme de croissance et de résistance aux traitements.

Le modèle animal est donc indispensable et non substituable pour de telles études, avant de commencer des études chez l'homme.

Réduire : dans l'objectif de réduire le nombre d'animaux, des tests *in vitro* seront effectués avant tout essai sur l'animal. Le nombre d'animaux utilisés tiendra compte des contraintes statistiques et nous conserverons tous les prélèvements d'organes et tissus pour des analyses ultérieures.

Raffiner : nous assurerons une surveillance quotidienne des animaux par l'expérimentateur dès la période critique et nous fixerons des points limites stricts qui conduiront à la mise à mort dès leur apparition. Nous assurerons aux souris un hébergement de qualité avec 5 souris par cage enrichie.

Ces études nécessitent impérativement un tissu tumoral en place dans un système physiologique pharmacodynamique et comprenant un réseau vasculaire capable de se remodeler à partir de toute cellule de l'organisme. Il n'existe aucune procédure *in vitro* qui puisse remplacer ces expériences.

17119 Notre institut a pour mission de créer des lignées de rats et de souris génétiquement modifiées. Ces lignées peuvent devenir des modèles de maladies humaines et vont permettre de mieux comprendre leurs processus de développement. Ces modèles peuvent également répondre à d'autres intérêts scientifiques tout aussi importants (comme par exemple devenir des modèles de choix pour la

recherche fondamentale). Ces rongeurs, en tant que modèle de maladies humaines, vont également permettre de tester des médicaments et de valider (ou d'invalider) des cibles thérapeutiques.

A l'heure actuelle des connaissances, nous ne pouvons pas nous passer du recours aux animaux pour les études. Toutes ces techniques nécessitent l'utilisation d'animaux. La réduction du nombre d'animaux utilisés et leur bien-être est une préoccupation permanente. L'amélioration des techniques permet sans cesse de répondre aux exigences de réduction et de raffinement.

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

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

Il y a plusieurs techniques utilisées :

- micro-injection d'ADN (appelé transgène) dans le noyau d'un embryon âgé d'un jour (injection pronucléaire d'ADN)
- électroporation de composés CRISPR/Cas9 dans l'embryon
- mise en présence de vecteurs viraux inactivés (AAV, lentivirus) avec les embryons
- injection de cellules souches embryonnaires génétiquement modifiées dans la cavité d'un embryon souris âgé de 3,5 jours ou un embryon de rat âgé de 4,5 jours appelé blastocyste.

Ces embryons manipulés sont ensuite réimplantés dans une mère-porteuse, en pratiquant une intervention chirurgicale sous anesthésie et analgésie. La chirurgie se déroule sur un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie et du gel oculaire est placé sur les yeux pour prévenir le dessèchement. Ensuite, les souris restent en observation jusqu'à leur complet réveil en bonne forme, dans leur cage placée sur une platine chauffante à 30°C. Des enrichissements sont également mis à disposition dans les cages d'hébergement.

Les animaux, nés des mères-porteuses, sont ensuite analysés pour identifier les individus transgéniques.

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

Pour les souris, nous comptons 204 souris/projet. Il y a 250 projets par an envisagés sur 5 ans donc 255 000 souris au total.

Pour les rats, nous comptons 304 rats/projet. Il y a une centaine de projets envisagés sur 5 ans donc 152 000 rats au total.

Ainsi, un maximum de 407 000 animaux seront utilisés pour cette saisine.

17120 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 des agrégats dans les neurones avec la protéine FUS. Cette protéine est constituée de plusieurs domaines parmi lesquels le domaine de localisation nucléaire (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 dans lequel elle remplit de nombreux rôles. 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 à utiliser des animaux ne présentant la mutation FUS que sur un allèle. Il est important de noter que les mutations du gène FUS chez le patient sont associées à

des formes juvéniles de SLA, a progression rapide, critères non observés dans notre modèle de souris FUS delta NLS.

A présent nous souhaitons utiliser des modèles de souris transgéniques où la mutation de FUS peut-être induite ou retirée dans un type cellulaire donné. Nous analyserons alors si la délocalisation de FUS dans les interneurons corticaux et spinaux est suffisante pour le développement de symptômes moteurs et cognitifs. Les souris seront 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 réduit le nombre de souris utilisées. Nous proposons d'utiliser un maximum de 327 souris. La compréhension des mécanismes à l'origine de la délocalisation de FUS et 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 expérimental sont suffisant pour observer ou non un effet significatif. De plus, l'utilisation d'animaux consanguin limite la variabilité phénotypique.

- Raffiner : Les animaux sont maintenus en groupe social dans un environnement enrichi (nid, matériel à ronger). Nous avons défini des points limites clairs nous permettant d'intervenir de manière adéquate en cas de souffrance de l'animal.

17121 La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est un cancer qui prend naissance dans les cellules souches du sang et de mauvais pronostic. Le développement et le succès de nouvelles thérapies ciblées dépend essentiellement de la disponibilité de modèles animaux précliniques, tel que le modèle de greffe dérivée du patient (PDX) chez la souris qui est un des modèles le plus approprié pour les essais précliniques et le développement de nouveaux traitements contre la LAL.

Des études préalables ont déjà montré que l'activation de la voie de signalisation (la voie permettant de transmettre un message à l'intérieur d'une cellule) Notch est un événement majeur dans certains types de cancers LAL; cependant le rôle de cette voie dans le contexte du microenvironnement tumoral est très mal caractérisé à ce jour.

Pour cette raison, notre étude envisage de traiter des souris présentant des PDX de tumeurs LAL humaines avec des inhibiteurs ciblant la voie Notch uniquement dans la tumeur (humain), uniquement dans le microenvironnement tumoral (murin) ou dans les deux.

72 souris au total seront utilisées pour cette étude, 36 souris par modèle PDX (2 modèles différents).

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R sont les suivantes :

- « Réduire » le nombre d'animaux. Nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux minimal pour garder une puissance statistique suffisante.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, implique la notion de points limites : nous porterons une attention particulière au bien-être des animaux avec un suivi quotidien.

- « Remplacer ». Nous avons remplacé dès que possible le modèle *in vivo* par des modèles *in vitro*. En effet nous avons fait plusieurs tests *in vitro* qui nous ont permis d'identifier les traitements les plus adéquats pour cette expérimentation.

Les responsables de la mise en œuvre du projet comprennent au moins une personne habilitée à effectuer de la chirurgie sur le rongeur.

Afin d'améliorer le bien-être des souris, elles seront maintenues dans des cages techniplast d'une superficie de 500cm² où la litière est un mélange de litière et de copeaux de peuplier. L'enrichissement des cages se fera avec des briques de peuplier ou des carrés de cellulose.

17122 L'espérance de vie des femmes est passée de 48 ans à plus de 80 ans en un siècle. L'arrêt de la production d'œstrogènes à la ménopause (51 ans en moyenne) entraîne souvent un cortège de troubles fonctionnels (impactant la qualité de vie) et une moindre protection artérielle, métabolique et osseuse. Le traitement de la ménopause est donc un défi relativement récent, qui a connu des aléas à la suite de l'étude américaine réalisée chez des patientes en période largement post-ménopausique. Notre équipe travaille depuis longtemps à comprendre les effets protecteurs des œstrogènes vis-à-vis du développement de l'athérosclérose et du diabète de type II dans des modèles animaux. Grâce à des modèles de souris transgéniques uniques, nous essayons de comprendre comment les œstrogènes agissent en physiologie et physiopathologie, afin de trouver de nouvelles molécules qui permettent de découpler les effets bénéfiques (protection vasculaire, diabète, prévention de l'ostéoporose) des effets délétères (cancer du sein et de l'endomètre, thrombose), qui sont un frein au traitement hormonal substitutif de la ménopause mais aussi de la contraception (risque thromboembolique).

Pour comprendre l'impact des œstrogènes dans ces différents effets physiologiques et physiopathologiques, les souris femelles, sauvages ou transgéniques subissent ou non une ablation des ovaires pour supprimer la production endogène d'œstrogènes, et pour mimer ce qui se passe à la ménopause. Puis, ces souris sont soumises quelques semaines plus tard, à un traitement oestrogénique pour mimer le traitement hormonal de la ménopause.

L'analyse des différents effets des œstrogènes est alors effectuée par mesure du temps de saignement, ou des fonctions vasculaires.

De la naissance à la mort, les souris sont hébergées selon les conditions de la directive européenne, régies par les principes de remplacement, de réduction et de raffinement (Règle des 3 R).

Chaque lot de souris est composé de groupes sauvages et transgéniques (15 modèles d'invalidation), dont chacun sera traité ou non avec des traitements oestrogéniques (100 à 150 souris en fonction du nombre de traitement utilisés). 5000 animaux seront utilisés dans ces 9 procédures permettant d'étudier les effets vasculaires des traitements oestrogéniques. Le nombre de souris utilisées a été calculé pour donner des résultats statistiquement significatifs par un test ANOVA 2 facteurs (effet de la mutation génique et du traitement).

Le bien-être de l'animal est bien pris en compte avec enrichissement du milieu, et les conditions d'anesthésie sont adaptées à chaque procédure chirurgicale. Pendant les chirurgies, les souris sont maintenues sur des tapis chauffant et des anti douleurs sont utilisées pour les procédures modérées. Les souris sont surveillées quotidiennement.

L'ensemble des effets étudiés étant des effets physiologiques ou physiopathologiques, il n'y a pas d'autre alternative d'étude que l'utilisation d'animaux vivants. L'analyse des fonctions vasculaires ne peut être modélisée en boîte de pétri. Il n'y a donc pas d'alternative de remplacement. Le choix de l'espèce s'est orienté vers la souris car c'est le seul modèle pour lequel a été générée l'invalidation génique du récepteur aux œstrogènes de façon tissu-spécifique.

17123 Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des maladies du sang survenant le plus souvent chez le sujet âgé, pouvant évoluer en leucémie (cancer du sang).

Certaines cellules du sang comme les cellules Natural Killer (NK) participent à l'élimination des cellules cancéreuses. Mais des défauts du développement et de la fonction de ces cellules ont été observés chez des patients atteints de SMD en association avec un mauvais pronostic. L'environnement malade du site de production des cellules NK chez les patients SMD pourrait jouer un rôle dans ces anomalies.

Notre projet a pour but de trouver quels sont les mécanismes à l'origine du défaut des cellules NK et de trouver des molécules permettant de les restaurer et ainsi de retrouver une activité anti-tumorale efficace dans le cadre des SMD. Pour cela, nous recréerons un environnement humain malade par la mise en place de biomatériaux contenant des cellules des patients. Après 6 à 8 semaines des cellules NK seront injectées à souris irradiées (l'irradiation permet d'éviter le rejet des cellules humaines dans un environnement murin). Nous pourrons alors moduler leur activité vis-à-vis des cellules tumorales grâce aux nouveaux outils thérapeutiques que nous développons. La régression des cellules tumorales

sera suivie une fois par semaine par imagerie non invasive sur souris anesthésiées (durée de la procédure: 30 minutes).

Ce projet utilisera des souris dépourvues de système immunitaire (permettant ainsi de greffer un environnement de production des cellules NK humains malade ou non). Nous implanterons par une technique chirurgicale (incision de la peau à la base du dos de la souris anesthésiée puis mise en place d'un matériau biologique mimant l'environnement de production des cellules NK). Nous réaliserons ensuite des injections soit au niveau de ce site de production artificielle soit dans la circulation sanguine ou dans le péritoine (abdomen) de molécules potentiellement capables d'augmenter le développement et la fonction anti-tumorale des cellules NK. Ces injections seront réalisées sur souris anesthésiées (cas de l'injection dans le matériau implanté sous la peau) ou éveillées (injection dans la circulation sanguine ou dans l'abdomen) et débuteront entre 15 jours et un mois après la chirurgie et dureront un mois. La fréquence d'injection dépendra des molécules utilisées mais ne sera pas supérieure à une fois par jour.

Nos travaux réalisés *in vitro* ont déjà permis de trouver et tester différentes molécules prometteuses. Nous avons maintenant besoin de valider la preuve de concept de l'efficacité des thérapies par des expériences *in vivo* chez la souris. Les expériences de production des cellules NK et de validation de leur efficacité contre les cellules cancéreuses nécessitent un organisme complexe comme celui de la souris. En application de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement), aucune procédure de remplacement permettant d'éviter le recours à l'expérimentation animale n'est connue à ce jour. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés dans ce projet. Les groupes expérimentaux seront constitués de 5 souris, nombre minimum pour obtenir des résultats validés statistiquement. Ainsi pour mener à bien ce projet nous utiliserons 430 souris sur une période de 5 ans (1 procédure permettant de valider le modèle expérimental utilisant 70 souris, 240 souris pour tester 5 molécules capables de restaurer le développement des cellules NK et 120 souris pour valider la fonction anti-tumorale des cellules NK nouvellement produites). Enfin, nous veillerons à utiliser des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'anxiété et la détresse subie par les animaux, notamment en réalisant les procédures de chirurgie sous anesthésie et avec un système de scoring et un traitement analgésique adapté. Les procédures dureront au maximum 5 mois, et toutes les souris seront euthanasiées à l'issue de ces procédures. Un suivi journalier sera effectué et des points limites précoces ont été définis. Lorsqu'ils seront atteints, les souris seront euthanasiées.

17124 Le développement d'additifs alimentaires (comprenant de manière non-exclusive vitamines et métabolites, caroténoïdes, enzymes, immunostimulants, probiotiques, prébiotiques, modulateurs métaboliques du microbiome, acides organiques, et huiles essentielles) a pour objectif l'amélioration de la nutrition et de la santé animale. Les enzymes ont pour but d'améliorer la valeur nutritive des ingrédients utilisés dans les aliments pour animaux d'élevage, ou d'améliorer celle d'un nouvel ingrédient. Les caroténoïdes sont utilisés dans la pigmentation de la chair du poulet et des jaunes d'œufs de poules pondeuses. Les vitamines sont ajoutées à l'aliment sous forme de prémélanges et sont indispensables à la croissance des animaux d'élevage. Les immunostimulants, prébiotiques et probiotiques permettent d'améliorer le bien-être des animaux d'élevage tout en réduisant les effets de stress potentiels, en améliorant leurs défenses immunitaires et en stabilisant le microbiote intestinal. Les acides organiques, les huiles essentielles ou des combinaisons de ces produits sont développés comme alternatives à l'utilisation des antibiotiques, afin d'améliorer la santé gastro-intestinale des animaux, ainsi que leur performance.

Le présent projet a pour objectifs principaux :

- de contribuer à la découverte de nouveaux additifs alimentaires.
- de réaliser des études d'efficacité et de tolérance pour l'enregistrement de ces additifs.
- de rechercher de nouvelles applications pour les additifs déjà enregistrés.
- de comparer l'efficacité des additifs développés par notre établissement avec ceux du marché.

Le développement d'additifs alimentaires passe nécessairement par une étape d'enregistrement des dits additifs auprès des autorités compétentes. A ces effets, certains types d'études doivent donc être menées selon des modalités propre à chaque organismes d'autorisation, par exemple l'EFSA en

Europe ou CVM/FDA aux Etats-Unis d'Amérique. Malgré des différences notoires dans les attentes des différents organes de régulation, il est possible de séparer les essais en deux grandes catégories, des essais d'efficacité, visant à démontrer l'utilité d'un produit, d'une part, et les essais de tolérance visant à démontrer son innocuité aux doses recommandées, d'autre part.

Des études de tolérance peuvent être réalisées afin de contribuer à l'élaboration du dossier d'enregistrement demandé par l'EFSA (en Europe) ou la CVM/FDA (Etats-Unis d'Amérique). Ces études visent à démontrer l'absence de conséquences négatives des additifs utilisés aux doses recommandées sur la santé animale. Les protocoles d'étude, les paramètres étudiés, les types d'analyses statistiques et de rapport font l'objet, soit d'un échange avec les autorités de contrôle (dans le cas de FDA), soit sont détaillés dans des documents officiels (guidance). Ces attentes ou documents sont susceptibles d'évoluer et il convient donc de s'assurer du caractère actuel des connaissances.

Les études d'efficacité sont réalisées en utilisant des molécules ou mélanges de molécules identifiées lors d'un criblage initial *in vitro*. L'objectif de ces études et les différentes procédures pouvant être utilisées sont déterminés en fonction de la classe de l'additif. Ces études vont permettre d'évaluer les effets des additifs testés principalement sur la croissance, la digestibilité des nutriments, le bilan nutritionnel, la réponse immunitaire, la santé digestive, le microbiote, la pigmentation et la résistance au stress. Ces études peuvent être réalisées en amont de celles visant à démontrer l'innocuité du produit, ou couplées aux études de tolérance, là encore selon les attentes des autorités de contrôle FDA (aux Etats Unis).

Il convient de noter que le criblage *in vitro* mentionné ci-dessus peut avoir été réalisé en interne, au sein du centre de recherche, mais peut également avoir eu lieu en partenariat avec des universités ou des instituts de recherche tiers, publiques ou privés.

La recherche de nouvelles applications pour les additifs existants sur le marché a lieu en mettant en œuvre diverses approches scientifiques, qui vont amener à la réalisation d'études faisant appel à des procédures différentes telles que la résistance au stress ou une carence nutritive, réalisée en alimentant les animaux avec un régime déficient en phosphore et autres minéraux.

La comparaison avec d'autres additifs déjà présents sur le marché ou en développement est réalisée lors de tests d'efficacité similaires à ceux utilisés dans le cadre de la découverte de nouveaux additifs.

Le projet s'étend sur 5 années dans le but d'évaluer, de tester et de développer différents additifs alimentaires destinés aux volailles et prévoit l'utilisation de 76 750 volailles (poulets de chair et poules pondeuses).

Lors du processus de développement et d'enregistrements des additifs alimentaires, il est indispensable de tester l'efficacité des additifs développés sur l'animal auquel il est destiné, afin d'en démontrer l'efficacité et l'innocuité auprès des autorités habilitées à délivrer une autorisation de mise sur le marché. Le projet est conduit dans le respect de la règle des 3R avec comme mesures de raffinement le suivi quotidien de l'état de santé des animaux avec l'observation des points limites adaptés, des conditions d'hébergement définies de telle sorte que l'enrichissement des cages (clochette, miroirs, petites balles ...), la densité des animaux par cage, ou encore les paramètres environnementaux (température et hygrométrie...) procurent le maximum de confort aux animaux, et restent supérieurs ou égaux à la législation en vigueur (Arrêté du 01/02/2013). En règle générale, aucun animal ne reste isolé, en cage individuelle sans contact olfactif, auditif et visuel avec ses congénères, ceci afin de réduire au minimum l'anxiété et le stress des animaux.

17125 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) se manifeste par une augmentation anormale des pressions dans les petites artères pulmonaires qui relient le cœur aux poumons. Ce phénomène impose un effort au cœur qui à terme peut cesser de fonctionner. On ne sait pas encore guérir cette maladie, mais notre connaissance des mécanismes impliqués dans l'HTAP évolue de façon spectaculaire ces dernières années. Aujourd'hui, on sait que le facteur de croissance placentaire (PIGF) joue un rôle très important dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) et la perméabilité vasculaire, deux phénomènes perturbés dans l'HTAP. Nous avons obtenu des résultats sur des échantillons pulmonaires humains et des cultures de cellules qui indiquent des défauts dans la production de PIGF dans l'HTAP. L'objectif de ce projet est donc de mieux caractériser l'importance de

ce défaut en déterminant le rôle du facteur PIGF dans la mise en place et l'entretien du remodelage vasculaire pulmonaire qui est à l'origine du développement et de l'aggravation de l'HTAP. Pour cela, il nous faut compléter nos données préliminaires *in vitro* et sur échantillons humains par des études faisant appel aux deux modèles animaux complémentaires d'étude de l'HTAP : les modèles monocrotaline et hypoxie chronique. Ces modèles de référence sont en effet complémentaires et reconnus pour l'étude des phases précoces de la maladie et l'évaluation de potentiels traitements. Ce travail se fera en veillant au bien-être des animaux et à la bonne réalisation des expériences dans les règles de l'art. Pour cela, nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques forts et pertinents. Les animaux seront hébergés à 2 au minimum dans des cages adaptées avec eau et nourriture ad libitum. Pour réduire le stress, les cages seront enrichies à l'aide de cylindres en carton qui feront office de jouet. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire. Afin de prévenir toute douleur et souffrance qui pourraient survenir les rats seront examinés quotidiennement afin de détecter d'éventuels symptômes de douleur. Un nombre de 112 rats Sprague Dawley sera nécessaire pour l'ensemble de l'étude qui permettra de comprendre le rôle du PIGF dans le rétrécissement des artérioles pulmonaires, et donc, de déterminer si des thérapies ciblant ce facteur peuvent être envisagées pour des patients atteints d'HTAP.

17126 Nichées au sein de l'intestin, certaines souches d'*Escherichia coli*, nommées APEC (pour Avian Pathogenic *E. coli*) induisent de nombreuses pathologies dans les élevages avicoles : de la mortalité embryonnaire ainsi que des infections systémiques chez le jeune poussin. Ces dernières années, on assiste à une recrudescence élevée de la colibacillose aviaire, ce qui fait d'elle la première pathologie bactérienne de la filière et l'une des premières causes de prescription d'antibiotiques. À l'ère de l'augmentation mondiale de la résistance aux antibiotiques, des méthodes thérapeutiques et prophylactiques basées sur l'utilisation des phages représentent une approche pionnière pour développer des pratiques éco-innovantes durables. La phagothérapie est l'alternative aux antibiotiques qui sera sûrement la plus applicable à très court terme. La société a été sensibilisée à cette thérapie et la demande sociétale devient de plus en plus forte et pressante, notamment des éleveurs dont la priorité est de réduire les intrants médicamenteux. Le faible coût de cette thérapie la rend tout à fait compatible avec une utilisation en agriculture en maintenant la compétitivité des filières. En France, les phages ne possèdent plus d'autorisation de mise sur le marché en médecine humaine et vétérinaire. L'application de la réglementation relative aux médicaments n'est pas totalement adaptée au développement industriel de phages ce qui entraîne un flou juridique et législatif. Un positionnement sur l'utilisation des phages en tant qu'agent thérapeutique et bio-médicament doit être établi. Ceci passera obligatoirement par des études prouvant l'efficacité thérapeutique des phages *in vivo* et la faisabilité de la transposition aux conditions de l'élevage. Dans un modèle d'œufs embryonnés, nous avons montré qu'une association de 2 à 4 phages restaurait 100% de survie des embryons après un challenge par une souche APEC qui induit 80% de mortalité.

L'objectif de notre projet est de tester une approche innovante par les phages pour protéger ou guérir le poussin d'une atteinte colibacillaire au démarrage, période critique clé de l'élevage. L'efficacité des phages en prévention sera évaluée en inoculant *in ovo* des mélanges de phages à 12 jours ou 18 jours d'embryogénèse. Les poussins seront ensuite inoculés à 1 jour par une souche d'*Escherichia coli* pathogène aviaire (remarque : au vu de la diversité des souches APEC, 3 souches seront testées). Suite à cette infection, la santé des poussins sera suivie en déterminant l'apparition, la gravité des symptômes et la survie/mortalité. La technologie d'injection *in ovo* étant largement utilisée au sein de la filière pour la vaccination, notre proposition d'intervention prophylactique par les phages pourrait être facilement opérationnelle sur le terrain. L'efficacité des phages en protection sera évaluée en administrant des cocktails de phages quelques heures après l'inoculation à des poussins de 1 jour d'une souche APEC, puis en monitorant leur santé.

Ce projet nécessitera l'utilisation au maximum de 3120 œufs embryonnés et 840 poulets de lignée PA12 dans le respect de la règle des 3Rs afin de pouvoir caractériser l'efficacité de la phagothérapie en protection ou en prévention de la colibacillose aviaire du poussin.

Remplacement: Les études testant l'efficacité des phages contre la colibacillose du jeune poussin, ne peuvent pas être remplacées par des approches strictement *in vitro* dans des milieux de culture bactériennes.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation, preuve d'efficacité des phages avec comparaison à des témoins positifs (infecté et traité avec un ATB), négatif (infecté et non traité) et deux contrôles d'essai (non infecté et non traité ; traitement par les phages seul).

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 (vie en groupe sur paille broyée et des structures d'enrichissement (lampes chauffantes et objets suspendus) et comportemental (visite bi-journalière des animaliers, observations de leur comportement en groupe, utilisation de enrichissement).

17127 Les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) sont des pathologies constituant un véritable enjeu de santé publique, puisqu'elles sont particulièrement handicapantes, incurables actuellement, et les approches de prise en charge des symptômes sont d'une efficacité relative. Ces pathologies sont multifactorielles et complexes. Elles se manifestent par des poussées inflammatoires plus ou moins longues et fréquentes selon les patients. Dans ce contexte, comprendre les facteurs impliqués dans le déclenchement des MICI est indispensable pour établir de nouvelles prises en charges des patients, en particulier des approches préventives chez les patients à risque (prédisposés génétiquement en particulier).

Des études épidémiologiques indiquent qu'un apport calorique important et le surpoids semblent être associés avec un risque augmenté de MICI et des prises en charge plus compliquées des patients. A l'inverse, une diminution de l'apport calorique semble avoir un effet bénéfique sur des pathologies inflammatoires telles que l'asthme, le diabète, l'arthrite ou encore certains cancers. Compte tenu de ces observations, la compréhension des mécanismes liant l'apport calorique et l'inflammation intestinale est importante.

Notre étude consiste d'une part à comparer la sévérité de l'inflammation intestinale induite par un agent colitogène chez des souris préalablement soumises à différents régimes alimentaires hypocaloriques, d'autre part à identifier les mécanismes cellulaires et physiopathologiques responsables de la modulation de la sévérité de l'inflammation.

La physiologie de l'intestin est complexe et la réponse inflammatoire implique de nombreux acteurs présents dans l'ensemble de l'organisme d'où l'utilisation de modèle *in vivo*, sur des souris car il existe des modèles transgéniques permettant d'étudier les maladies métaboliques en lien avec le surpoids, ce qui permettra de faire des liens avec ces modèles, ou d'envisager des poursuites de notre travail avec ces modèles transgéniques.

1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche *in vitro* car l'étude porte sur un régime alimentaire et la nutrition fait intervenir des processus physiologiques complexes qui interagissent.

2. Réduction : l'étude portera sur des souris mâles de laboratoire, réparties en 4 groupes d'études selon l'objectif :

- Effet protecteur d'une restriction calorique chez des souris Wild Type (C57Bl6)

o Groupe témoin régime normal

o Restriction alimentaire 20 % (soit 80% d'apport en régime normal) durant 1 semaine répété 3 fois

o Restriction 30 % sur le même schéma

o Restriction 40% (voire annexe)

Chaque groupe sera subdivisé en sous-groupes : traités ou non traités avec l'agent colitogène (DSS). Ainsi, 80 souris seront nécessaires dans cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

3. Raffinement : toutes les procédures expérimentales (régime spécial, traitement pro-inflammatoire, coloscopie) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal et les coloscopies se feront sous anesthésie générale. Une procédure d'estimation et suppression de la

douleur est mise en place. Le point limite est fixé 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 de plus de 20%, déshydratation, yeux et abdomen creux). En fin de protocole, les animaux seront euthanasiés et les organes prélevés pour permettre des analyses biologiques.

17128 L'importance des interactions entre un hôte et son microbiote intestinal est connue de longue date. Ce champ d'investigation a connu ces dernières années des avancées sans précédent, notamment chez les animaux d'élevage, car le microbiote intestinal est au carrefour de fonctions physiologiques majeures sous-jacentes à de nombreux caractères d'intérêt (santé et immunité, croissance, efficacité alimentaire, bien-être, etc.). L'identification de leviers permettant d'orienter les microbiotes des animaux d'élevage offre des perspectives originales et extrêmement intéressantes pour mieux utiliser des ressources alimentaires plus variées, réduire les rejets, diminuer l'usage des antibiotiques, améliorer la santé et le bien-être animal, et contribuer ainsi à améliorer la durabilité de l'élevage.

Le tube digestif, stérile in utero, est colonisé après la naissance par des espèces microbiennes qui se diversifient progressivement pour s'organiser en un écosystème qui reste relativement stable au cours de la vie. Comprendre comment se façonne le microbiote d'un individu est capital pour pouvoir le moduler. L'alimentation est reconnue comme un des déterminants importants mais l'environnement de naissance, lié à la transmission maternelle, et la génétique de l'hôte contribuent à façonner le microbiote.

Il s'agit ici de déterminer la part respective, chez le porc, de ces deux derniers facteurs sur la mise en place du microbiote dès la naissance puis de son évolution ultérieure.

Le projet s'appuie sur une expérience de sélection directionnelle conduite dans une population de porcs Large White. Cette sélection a permis de créer deux lignées qui diffèrent pour la composition du microbiote à 60 jours d'âge. L'adoption de porcelets d'une lignée par une truie d'une autre lignée permettra, de manière formelle, grâce à la grande variabilité créée par la sélection, de distinguer les effets de la génétique de l'hôte de la contribution maternelle. Identifier les modalités de transmission et d'évolution du microbiote chez le jeune doit permettre, à terme, de proposer des voies d'amélioration en élevage de la santé et du bien-être des porcs. L'expérimentation sera conduite sur 32 truies et 192 porcelets, soit 224 individus.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur le porc sont requises car il s'agit de l'espèce cible. L'objectif est d'explorer le déterminisme génétique et la transmission maternelle de la composition du microbiote à des fins de sélection et d'élevage, notamment pour améliorer la santé et le bien-être des animaux. Réduction : l'utilisation d'animaux issus de lignées sélectionnées présentant une divergence génétique contribue à réduire le nombre d'animaux grâce à l'augmentation de la variabilité de l'hôte. Statistiquement, l'effectif a été ajusté en fonction de la divergence pour mettre en évidence de manière significative des différences de moyenne de 1/2 écart-type avec une puissance de 0,75. Raffinement : les méthodes de prélèvements employées sont peu ou pas invasives et sont mises en œuvre par un personnel expérimenté de façon à limiter le temps d'intervention et le stress des animaux. Les animaux sont élevés dans les conditions réglementaires de l'élevage porcin avec un enrichissement du milieu adapté au porcelet.

17129 En réponse à l'augmentation de la fréquence des pathologies artérielles comme l'obstruction des artères (sténose voire thrombose) ou leur dilatation (anévrisme), des techniques thérapeutiques mini-invasives se sont développées. Ces techniques appartenant au domaine de la radiologie interventionnelle et endovasculaire permettent de limiter les conséquences d'interventions lourdes sur les patients. Cependant, elles nécessitent une formation pratique adaptée pour les praticiens.

L'objectif de ce programme est de former les praticiens interventionnels aux différentes techniques d'embolisation artérielle (dilatation des artères) et d'angioplastie artérielle (remodelage des artères) afin qu'ils puissent réaliser ces techniques chez l'homme sans risque. Il y aura une alternance de formation internes et de workshops avec des praticiens extérieurs français ou étrangers.

Afin d'être au plus proche de la procédure chez l'homme, avec gestion des flux artériels, l'apprentissage sur animal vivant est essentiel. En effet, il n'existe actuellement pas de simulateur permettant de mimer

ces flux et donc de remplacer l'utilisation d'animaux vivants. Le modèle choisi est le porc, car son anatomie vasculaire est comparable à celle de l'homme et permet donc d'utiliser le même matériel et de rencontrer les mêmes problématiques.

Dans une optique de raffinement, les porcs arrivent sur place une semaine avant chaque session de formation pour leur permettre de s'habituer aux lieux et ainsi de diminuer leur stress. Lorsqu'il y a plusieurs animaux, ils sont logés dans la même case pour respecter leur comportement grégaire. Les boxes ont une superficie de 5,3 m² et sont agrémentés de jouets pour le bien-être des porcs. En cas de température inférieure à 10 degrés dans l'animalerie, un système de chauffage individuel est activé. De plus, durant la procédure, la température rectale et la fréquence cardiaque sont monitorés afin de s'assurer du bien-être des animaux et des points limites concernant ces données physiologies sont déterminés. En cas d'atteinte de ces points limites la procédure sera interrompue.

Les interventions se déroulent sous anesthésie générale et les animaux sont mis à mort à la fin de chaque session de formation. Afin de réduire le nombre d'animaux impliqués, jusqu'à quatre techniques d'embolisation et quatre techniques d'angioplastie pourront être appliqués par animal. Cette mesure permet de limiter à huit le nombre de porcs nécessaire au maximum par an, soit quarante au maximum sur 5 ans.

17130 L'imagerie *in vivo* du petit animal est un puissant outil d'analyse des modèles murins, permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'obtenir plus d'informations d'un modèle murin, notamment des informations fonctionnelles.

L'échographie est une modalité d'imagerie accessible, non ionisante et non traumatisante. Plusieurs centres de recherche sont équipés d'appareils d'échographie dédiés au petit animal, pour l'étude des pathologies humaines ou pour la recherche fondamentale. Dans le cas d'études portant sur le cœur, il faut impérativement évaluer la fonction cardiaque *in vivo*. C'est le seul moyen d'attester que les modifications anatomiques ou histologiques observées ont bien un impact réel sur la fonction cardiaque.

L'échographie cardiaque est l'examen de première intention qui permet d'évaluer la fonction cardiaque (débit, contractilité, anomalies de flux au niveau des valves) et le plus utilisé dans les études sur le petit animal, en raison notamment de son faible coût et de son innocuité (les examens sont réalisés sous anesthésie générale et sont non invasifs).

Cette méthode est donc un outil de référence pour attester de l'efficacité de traitements ou pour l'étude de modèles murins de pathologie cardiaque. Elle participe à la réduction du nombre d'animaux nécessaires puisqu'elle autorise des examens répétés sur les mêmes individus et apporte beaucoup d'informations sur le fonctionnement du cœur de chaque individu suivi (refinement).

Toutefois, l'échocardiographie est une technique qui nécessite une certaine technicité et une grande rigueur dans sa réalisation, sans quoi les mesures peuvent être biaisées et rendre des études impliquant nombres d'animaux peu ou pas contributives.

Il existe tout un ensemble de règles d'acquisition tirées de la pratique humaine qui permettent de standardiser les procédures et d'arriver à des résultats fiables avec un minimum de dispersion statistique et donc un nombre moindre d'animaux à étudier. Il existe également tout un ensemble de gestes techniques et de précautions à prendre spécifiques de l'étude du petit animal sous anesthésie.

Il existe toutefois peu de formations ouvertes aux chercheurs et techniciens de laboratoire permettant d'acquérir les bases théoriques et pratiques pour une bonne échocardiographie.

Nous souhaitons donc organiser plusieurs sessions de formations en échographie cardiaque à destination des chercheurs, ingénieurs et techniciens des secteurs académiques ou privés pour partager nos connaissances, et permettre aux utilisateurs de réaliser des mesures fiables de la fonction cardiaque, de manière non invasive et non traumatique, et de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les études liées à la fonction cardiaque.

Cette formation comprend une partie théorique rappelant les bases de la physique ultrasonore et de la fonction cardiaque. Plusieurs travaux pratiques sont organisés, permettant d'apprendre à positionner

la sonde, poser des mesures sur des petits animaux sains et sur un modèle murin représentatif d'une des principales pathologies étudiées.

Nous proposons d'organiser 3 sessions par an pour les 5 prochaines années. Chaque session nécessite l'emploi de 9 souris saines et 9 mimant une pathologie cardiaque couramment étudiée, 3 rats et 3 rats mimant également la même pathologie. Nous utilisons les mêmes animaux d'une journée de formation à l'autre, réduisant le nombre d'individus nécessaires, puisque l'examen est non invasif et non traumatisant. Par contre nous utilisons un nombre suffisant d'animaux pour que chaque individu ne reste pas plus d'une heure anesthésié et donc limiter le temps récupération après anesthésie. Des points limites ont été définis, conduisant à l'arrêt de la procédure d'imagerie sous anesthésie en cas d'insuffisance respiratoire, ou à l'euthanasie en cas d'impossibilité de récupération de l'animal.

Au total 270 souris et 90 rats seront utilisés pour ce projet

17131 Les dilatations de l'aorte sont caractérisées par une dégradation de la paroi vasculaire conduisant à une fragilisation des artères. La rupture brutale de l'aorte est alors possible et létale. A ce jour aucun traitement n'est pour le moment disponible pour ralentir la progression de la pathologie, en raison de connaissances insuffisantes sur les mécanismes impliqués. De nombreux gènes ont déjà été identifiés comme étant impliqués dans le développement des dilatations de l'aorte. Cependant il n'y a que 30 % des patients avec des formes génétiques qui ont eu leur mutation identifiée. Il a été identifié 3 nouveaux gènes associés au développement des dilatations de l'aorte mais nous ne connaissons pas à ce jour leurs rôles exacts dans l'apparition de la maladie.

Pour comprendre les mécanismes d'apparition de la maladie, nous souhaitons étudier la formation des dilatations aortiques dans 4 populations distinctes de souris : des souris contrôles et des souris n'exprimant pas nos gènes d'intérêts (3 gènes). Nous utiliserons sur chacune de ces populations de souris un seul modèle expérimental de dilatation. Ce modèle est un traitement pharmacologique bien décrit et validé dans la littérature scientifique. Celui-ci est basé sur l'implantation d'une pompe délivrant la molécule, avec ou sans administration de molécules dans l'eau de boisson qui fragilisent les artères et provoquent l'apparition de la maladie.

Le traitement avec les molécules dans l'eau des biberons durera 1 semaine, suivi directement par l'implantation d'une pompe en sous-cutanée à la base du cou pour délivrer les molécules en continu qui sera pratiquée sous anesthésie et analgésie avec un suivi post-opératoire. Les animaux seront surveillés quotidiennement et les critères de traitement pour soulager l'animal et/ou les critères d'arrêt définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance. Une grille de points limites adaptés et précoces sera mise en place pour anticiper au maximum les douleurs post-opératoires, avec administration d'antidouleurs dans un premier temps, suivie par une euthanasie dans les formes les plus graves. Durant les procédures, le système cardiovasculaire des souris sera étudié par imagerie après anesthésie gazeuse des animaux, et ces mêmes animaux seront euthanasiés, en fin de procédure, afin d'analyser les tissus.

Au total ce projet fera appel à 340 souris sur une durée de 5 ans, divisées en 3 groupes (un groupe de 120 et deux groupes de 110). Chacun des groupes correspond à un gène étudié, et avec des souris contrôles. Le nombre de souris entrant dans ce projet est réduit au maximum afin de faire appel au moins de souris possible tout en gardant l'étude statistiquement correcte.

Dans ce projet, la règle des 3R sera respectée. Des expériences ont été menées *in vitro* afin de remplacer autant que possible l'utilisation de ces animaux. Cependant, la complexité des mécanismes à l'origine des dilatations requiert l'utilisation d'un organisme complet. Nous réduirons au maximum le nombre de souris utilisées, tout en nous assurant que les études réalisées nous permettent d'effectuer les analyses statistiques nécessaires. Nous raffinerons l'environnement des animaux par enrichissement de leur milieu de vie, par gestion de la douleur grâce à la mise en place de grille de points limites précoces, ainsi que l'application de procédures n'affectant pas, ou très peu, le comportement naturel des animaux.

17132 Le sepsis (communément appelé septicémie) se caractérise par une réaction inflammatoire systémique exacerbée en réponse à une infection généralisée. Ordinairement, la détection de molécules

bactériennes étrangères par le système immunitaire, provoque l'activation des monocytes (cellules sanguines en charge des défenses immunitaires) et la production de cytokines pro-inflammatoires, cette cascade de signaux stimulant le recrutement de nouvelles cellules immunitaires pour combattre l'infection. Cependant, pendant un sepsis, la présence de pathogènes dans le sang engendre une activation incontrôlée et excessive du système immunitaire pouvant provoquer une hypotension, une défaillance multiviscérale et éventuellement la mort du patient.

Le sepsis est la principale cause de décès dans les unités de soins intensifs dans le monde, avec un taux de mortalité pouvant atteindre 50% en cas de choc septique. Malgré les améliorations récentes du diagnostic ainsi qu'une meilleure prise en charge des patients, il n'existe toujours pas de thérapies approuvées qui modèleraient la réponse inflammatoire. En effet, un des obstacles rencontrés lors du développement de traitements anti-inflammatoires du sepsis est la difficulté de réduire la phase inflammatoire de la maladie sans affaiblir le système immunitaire du patient nécessaire pour combattre l'infection.

Traf-Stop, une nouvelle molécule anti-inflammatoire hautement spécifique qui n'affecte pas le système immunitaire ni la réponse antibactérienne, semblerait être un bon candidat.

Nous proposons de développer des nanoparticules lipidiques, (petites vésicules sphériques composées de lipides) qui vont transporter Traf-Stop. L'intérêt de ces nanoparticules est de protéger le médicament pendant le transport dans le sang jusqu'à sa cible thérapeutique et ainsi d'améliorer l'efficacité thérapeutique tout en diminuant les effets indésirables potentiels. Le deuxième intérêt de ces nanoparticules est que l'on peut accrocher à la surface des vésicules des éléments, appelés aptamères, capables de reconnaître une cible cellulaire. Les premiers effecteurs de la réponse inflammatoire généralisée dans le sepsis étant les monocytes, il apparaît pertinent de cibler ces cellules afin de limiter leur effet.

La combinaison proposée de ciblage spécifique des monocytes sanguins avec un anti-inflammatoire spécifique ne diminuant pas l'immunité est ainsi unique et devrait conduire à la réduction de la composante inflammatoire du sepsis sans affaiblir le système immunitaire. Les premiers tests *in vitro* et *in vivo* ont déjà montré que notre stratégie a un fort potentiel de ciblage et d'activité anti-inflammatoire. Ainsi cette étude nous permettra d'évaluer et de valider dans un modèle de choc septique nos nanoparticules-aptamères avec comme objectif un effet anti-inflammatoire et en conséquence une protection multi organes et une meilleure survie.

Une partie de ces études sera menée sur des souris. Le sepsis est une maladie inflammatoire à composantes multiples et complexes (réaction inflammatoire multicellulaires, surproduction de radicaux libres, hypotension) conduisant à une réponse inflammatoire dérégulée et inappropriée de l'hôte qui engendre une défaillance globale des organes. Le passage à un modèle animal à ce stade est incontournable. La souris est le plus petit modèle animal qui imite le système immunitaire humain et le modèle de sepsis par ligature et ponction du cæcum (CLP) est considéré par la communauté scientifique comme le modèle de sepsis le plus pertinent de la phase pro-inflammatoire du sepsis. Il consiste à perforer le caecum, libérant ainsi des matières fécales dans l'abdomen qui vont générer une réponse immunitaire exacerbée induite par une infection polymicrobienne.

Dans un souci de réduction, l'étude sera menée, dans un premier temps, *in vitro* sur des lignées immortalisées de monocytes et des monocytes primaires. Les meilleures formulations seront ensuite testées *in vivo* sur un modèle CLP de sepsis.

Une planification statistique minutieuse permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Pour la réalisation de ce projet, nous utiliserons 216 souris sur 5 ans.

Les animaux seront hébergés en groupes dans un environnement enrichi afin de favoriser leur bien-être. Les méthodes utilisées seront appropriées pour réduire le plus possible le stress que pourraient ressentir les animaux. Les animaux seront anesthésiés pour la procédure chirurgicale et traités avec un analgésique en préopératoire et 2 jours en postopératoire afin de réduire la douleur. Tout au long des procédures, ils seront surveillés étroitement et une grille d'évaluation très détaillée de l'état général des animaux sera mise en place, qui permettra de suivre l'évolution du sepsis et de mettre en place des points limites le cas échéant.

17133 La maladie de Willebrand est la plus fréquente des maladies hémorragiques génétiques, affectant jusqu'à 1% de la population dans sa forme modérée. Elle est provoquée par des défauts quantitatifs ou qualitatifs dans une protéine plasmatique circulante, le facteur Willebrand. Cette très grosse protéine a pour rôle d'initier le processus de coagulation sanguine en cas de blessure au niveau d'un vaisseau sanguin. Pour cela il établit un pont moléculaire entre la paroi vasculaire lésée et les plaquettes sanguines.

Il existe plusieurs catégories de maladie de Willebrand en fonction du type de défaut qui est présent sur la protéine. Lorsque le facteur Willebrand est totalement absent, on parle de maladie de Willebrand de type 3 ou sévère. Lors d'une diminution entre 50% et 95% de la quantité normale de facteur Willebrand, on parle de maladie de Willebrand de type 1. Quant à la maladie de Willebrand de type 2, il s'agit de défauts qualitatifs. Là aussi, il existe plusieurs sous-groupes en fonction de la fonction affectée. Le sous-type qui est le plus intrigant et le plus difficile à traiter est le type 2B. Il s'agit de patients chez qui le facteur Willebrand porte des mutations ponctuelles qui rendent la protéine plus active, ce qui va entraîner un défaut de fonction des plaquettes sanguines, le partenaire cellulaire principal du facteur Willebrand. Les patients atteints de maladie de Willebrand de type 2B cumulent une dysfonction du facteur Willebrand, une dysfonction des plaquettes et également un nombre de plaquettes réduit. De ce fait, un traitement optimal doit faire appel à des concentrés de facteur Willebrand mais aussi à des transfusions de plaquettes. Toutefois les plaquettes injectées vont éventuellement être inactivées par le facteur Willebrand muté présent chez le patient, ce qui réduit leur efficacité thérapeutique.

Le but du projet est de tester l'infusion de plaquettes synthétiques, (en fait des nanoparticules lipidiques qui miment l'action des plaquettes) sur le phénotype hémorragique dans un modèle murin de maladie de Willebrand de type 2B. A l'instar des « vraies » plaquettes, ces particules peuvent se lier au facteur Willebrand (y compris le facteur Willebrand muté) mais contrairement aux plaquettes, leur fonction ne sera pas affectée par la présence de la mutation 2B sur le facteur Willebrand car elles ne possèdent pas le récepteur qui est responsable de cet effet.

L'hémostase est un processus complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs moléculaires et cellulaires. Actuellement les tests disponibles *in vitro* ne permettent pas de reproduire l'intégralité de ce processus. Par conséquent, afin de tester l'efficacité des plaquettes synthétiques, il est crucial de pouvoir tester leur effet dans un modèle animal reproduisant une pathologie hémorragique.

Nous prévoyons d'utiliser 248 souris au maximum pour ce projet. Des groupes de 8-10 souris sont prévus afin d'assurer une réponse statistiquement analysable. Potentiellement, seulement 128 souris peuvent être utilisées selon les résultats obtenus dans la première procédure.

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.

17134 Le diabète est un problème de santé publique qui atteint plus de 460 millions de personnes dans le monde. Les patients présentent de nombreux symptômes très divers mais notamment des problèmes de cicatrisation avec des blessures qui ont des difficultés à cicatrifier, appelées plaies chroniques. Les ulcères du pied diabétique (UDP) sont une complication courante et grave du diabète sucré, et sont associés à une morbidité importante et sont la principale cause d'amputation non traumatique des membres inférieurs. Le traitement des UDP est particulièrement difficile. Outre les mesures étiologiques (c'est-à-dire le contrôle de la glycémie), le traitement local des ulcères du pied repose principalement sur le débridement de la plaie et les pansements. Les mesures complémentaires essentielles comprennent le relâchement de la pression et le contrôle de l'infection. Cependant, malgré ces traitements, les complications sont fréquentes, car environ 25 % des patients atteints d'UDP subiront une amputation du pied, ce qui souligne la nécessité de nouveaux traitements. La microcirculation joue un rôle clé dans la survie des tissus en maintenant la perfusion et l'homéostasie des fluides, et en fournissant de l'oxygène et des nutriments. Le flux sanguin est régulé par plusieurs substances

vasodilatatrices et vasoconstrictrices qui sont libérées par l'endothélium dans les cellules musculaires lisses vasculaires environnantes, ce qui permet d'améliorer le tonus vasculaire.

Le dysfonctionnement vasculaire dans le diabète est majoritairement attribué à l'absence d'un vasodilatateur. Toutefois il existe d'autres facteurs vasodilatateur, comme la prostacycline (PGI2). Il est de plus en plus évident que la voie de la PGI2 est dérégulée dans le diabète, et peut aussi contribuer au dysfonctionnement microvasculaire.

Ainsi, notre projet de recherche vise 1) à explorer les altérations de la voie PGI2 dans la peau de modèles murins d'ulcères liés au diabète et 2) à déterminer si le ciblage de la voie PGI2 peut fournir un traitement pour les ulcères de pression. Nous visons tout d'abord à évaluer la réactivité microvasculaire dépendante de PGI2 entre des souris diabétiques et des témoins. La modulation pharmacologique de ces composants clés permettra d'établir quel composant de la voie est affecté.

Puis, nous explorerons l'importance de la voie PGI2 dans le processus de cicatrisation après l'induction de blessures cutanées de différentes origines. Des expériences seront réalisées avant la blessure et sur la peau cicatrisée.

Le protocole utilisé sera conforme aux exigences des 3R de la réglementation française concernant l'expérimentation animale.

Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux.

Pour chaque procédure, le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs sera utilisé.

Les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi afin d'éviter le stress. Un personnel qualifié s'assurera du bien-être des animaux au quotidien. L'apparence physique, le comportement et la réponse à des stimuli externes seront observés quotidiennement et la procédure sera stoppée si l'animal présente des signes de mal-être.

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 4620 souris sur une période de 5 ans.

Lors des mesures de la microcirculation et lors des inductions de plaie, les souris seront sous anesthésie générale. A la suite de plaies sévères, les souris bénéficieront d'un traitement antalgique sur plusieurs jours.

Pour le suivi de la cicatrisation nécessitant une immobilisation des souris et afin de limiter leur stress, celles-ci seront maintenues sous une légère anesthésie gazeuse à l'isoflurane.

Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué au minimum 3 fois par semaine. L'observation de signe de douleur ou de mal-être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal.

En cas d'atteinte d'un point limite en cours d'expérimentation, la souris sera mise à mort.

17135 Les habitudes alimentaires ont beaucoup évolué ces dernières décennies, d'abord dans les pays occidentaux, puis dans les pays en voie de développement, avec en parallèle une augmentation de la prévalence de l'obésité, du syndrome métabolique et du diabète. Dans ce contexte, il a été rapporté que la consommation de glucides à fort index glycémique (boissons sucrées, préparations alimentaires industrielles, tout type de sucre ajouté) est augmentée dans toutes les classes d'âge et participe activement au développement de ces pathologies. La principale cause de morbi-mortalité chez ces patients sont les maladies cardiovasculaires. De nombreuses études ont mis en évidence le lien entre dysfonction vasculaire, sensible aux modifications du métabolisme énergétique à l'origine de processus inflammatoires et oxydatifs, et altération de la fonction cardiaque chez ces patients. Ainsi, pour limiter les effets délétères des sucres ajoutés sur la santé métabolique et cardiovasculaire notamment, des substituts de type édulcorants sans valeur nutritive (très peu ou zéro calories ; produits light ou sans sucres) ont été proposés. Parmi ces molécules approuvées (aspartame, saccharine, acesulfame potassium, stevia par exemple) dans l'alimentation, le sucralose représente 62% du marché des édulcorants dans le monde. Ces édulcorants possèdent un pouvoir sucrant par gramme très supérieur à un produit sucrant calorique tels que le glucose, sucrose, sirop de maïs ou encore les concentrés de jus de fruits. Selon les dernières estimations, plus de 15% des produits alimentaires ou boissons consommées comportent des édulcorants contribuant ainsi à une augmentation progressive de la

consommation chez l'adulte et l'enfant. Cependant, des études chez l'animal montrent qu'une consommation régulière de boissons ou aliments édulcorés est associée à une augmentation de la prise alimentaire et du poids. Chez l'Homme, leur consommation a été associée à un risque accru d'accouchement prématuré chez les femmes enceintes, un risque d'hypertension artérielle mais également à l'augmentation de l'indice de masse corporelle et de complications cardiométaboliques. Ainsi, il semble important de comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents induits par les édulcorants afin de prévenir chez les populations saines et à risques, des complications ou aggravation cardiovasculaires et métaboliques. Les altérations de la fonction vasculaire chez les sujets atteints d'une pathologie métabolique résultent d'un ensemble complexe d'interactions entre les différents tissus et impliquent des processus biologiques systémiques et locaux complexes (inflammatoires, stress oxydant par exemple).

L'objectif de cette étude sera donc d'évaluer, chez un modèle de souris saine ou obèse et diabétique, les effets d'une consommation d'édulcorant (sucralose, acesulfame potassium ou une combinaison de ces 2 édulcorants) sur la fonction vasculaire, et de caractériser les mécanismes intervenant dans les processus observés. Les altérations vasculaires contribuent au développement de plaies chroniques avec un défaut du processus de cicatrisation. L'objectif est de déterminer les mécanismes impliqués dans le processus de cicatrisation.

Au cours du protocole de 16 semaines de régime (standard ou obésogène associé ou non à une supplémentation en sucrose, ou en édulcorants (sucralose, acesulfame potassium ou combinaison des 2) à des doses journalières basées sur la consommation humaine, des évaluations de la microcirculation cutanée par Laser Doppler seront réalisées afin de pouvoir comparer l'effet de ces différents régimes sur la vasomotricité au niveau de la peau qui est un indicateur périphérique précoce des modifications cardiovasculaires. Dans un deuxième temps, nous souhaitons étudier l'effet de ces régimes sur la cicatrisation de plaies ischémiques de compression. Toutes nos expérimentations seront menées sur les deux sexes.

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.

Lors des anesthésies nécessaires pour l'étude de la microcirculation cutanée ou lors des inductions de plaies ischémiques de compression, les souris seront placées dans un environnement chauffé afin d'éviter l'hypothermie.

Une fois les expérimentations terminées, les souris seront toutes mises à mort et des échantillons de peau et de vaisseaux seront prélevés. Ces échantillons vasculaires permettront (1) des études fonctionnelles de réponses vasculaires *ex vivo* sur des vaisseaux isolés et (2) des analyses histologiques, protéiques et moléculaires approfondies.

Ce projet concernera 2100 souris au maximum.

17136 La pollution atmosphérique est un enjeu majeur de santé publique dans le monde entier. Durant les dernières années, l'exposition à des particules fines a été associée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité chez l'Homme suite au développement de pathologies pulmonaires. Parmi ces particules fines, les aérosols organiques secondaires (SOA, secondary organic aerosols) sont produits par l'oxydation de composants organiques volatiles, émises par des sources naturels ou humaines. Ces SOA représentent une part importante des aérosols totaux auxquels nous sommes exposés. Cependant leur impact sur la santé reste obscur. Quelques études préliminaires *in vitro* ont notamment reportés une augmentation de marqueurs inflammatoires et de mort cellulaire. Cela souligne l'importance de comprendre les mécanismes inflammatoires médiés par l'exposition aux SOA et leurs effets sur la santé. Ce projet vise à déterminer les effets biologiques de ces SOA sur les poumons et

les mécanismes impliqués dans la mise en place et l'évolution de l'inflammation induite par cette pollution, grâce à un modèle murin d'exposition à ces particules.

Les souris anesthésiées auparavant par nébulisation d'isoflurane recevront 1 fois par jour un volume de 50 µL de PBS avec ou sans particules, réparti en gouttelettes et en mouvement saccadé entre les 2 narines à l'aide d'un cône de micropipette. Les souris sont maintenues en position verticale afin de permettre une bonne répartition des particules dans l'arbre respiratoire, notamment au niveau des alvéoles pulmonaires. Le traitement et la position verticale dureront environ 1 min par souris. Les souris seront particulièrement surveillées durant leur réveil et dans la journée.

L'analyse de souris exposées aux SOA permettra une meilleure compréhension d'une part des interactions particules-cellules dans un contexte physiologique et d'autre part la réponse inflammatoire associée. Différents prélèvements sanguins et pulmonaires seront effectués sur les souris, après mise à mort, afin de réaliser des analyses histologiques, cellulaires et moléculaires. Cela nous informera sur les conséquences sanitaires d'une exposition à cette pollution encore méconnue et nous permettra d'identifier les SOA les plus délétères.

Remplacer : Afin de mener à bien ces investigations, nous avons mené en amont des études *in vitro*. Il s'agit à présent de prendre en considération l'organisme en entier pour un cadre plus complexe et réel. De plus, la souris est un modèle éprouvé et fiable.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum pour ne garder que le nombre nécessaire aux analyses statistiques.

Raffiner : Les souris seront hébergées par groupe, dans des conditions d'hébergement optimisées pour assurer leur confort (enrichissement, soins et suivi post-instillation). Une anesthésie générale sera réalisée avant toute instillation pour limiter tout risque de douleur et d'angoisse pouvant résulter de l'intervention. Les animaux seront observés 2 fois par jour et pesés 2 fois par semaine pour suivre leur prise de poids. Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux. La connaissance des modèles animaux a permis de définir des points limites précis.

Le total de souris pour ce projet est de 92 souris en 3 ans.

17137 Les modèles animaux ont grandement enrichi notre compréhension de nombreuses pathologies intestinales. En plus d'améliorer la compréhension de la pathogenèse de la maladie, les modèles animaux sont également utilisés de manière importante pour tester les candidats médicaments ainsi que pour les interventions diagnostiques ou thérapeutiques précliniques. Cependant, les stratégies de surveillance pour suivre l'évolution de la maladie murine ou l'effet des interventions thérapeutiques se limitent souvent à des observations indirectes ou à des analyses post mortem. Bien qu'il existe des procédures non invasives pour surveiller la vitalité des souris lors d'une modification de l'homéostasie intestinale comme les indices d'activité de la maladie, la quantification de la perte ou du gain de poids, les analyses de sang, d'urine et de fèces, ce ne sont que des indicateurs indirects et sont biaisés par la variabilité interindividuelle. De plus, les analyses post mortem empêchent les observations longitudinales à des moments répétés.

Des techniques d'imagerie sophistiquées ont été développées afin de surveiller l'activité de la maladie chez la souris. Ces techniques endoscopiques permettent une visualisation directe de l'inflammation intestinale ou la cicatrisation des plaies. Ce processus donne un état objectif en temps réel permettant des études longitudinales chez le même animal à des moments répétés.

Ces techniques d'imagerie sont maintenant très utilisées pour évaluer l'inflammation du côlon et la cicatrisation des plaies. L'analyse repose sur divers systèmes de notation tels que l'indice endoscopique murin de gravité de la colite (MEICS) qui se compose de cinq paramètres pour évaluer l'inflammation : épaissement de la paroi du côlon, changements du schéma vasculaire, présence d'ulcère, granularité de la surface muqueuse et consistance des selles.

En plus de ces interventions diagnostiques avec l'imagerie de la muqueuse et l'acquisition de biopsies, l'endoscopie digestive permet des interventions thérapeutiques telles que l'application locale de candidats-médicaments. Les systèmes endoscopiques peuvent être utilisés pour influencer thérapeutiquement une lésion distincte ou une inflammation localisée en permettant l'application directe

d'une substance dans la zone d'intérêt. De plus, comme les substances thérapeutiques et témoins peuvent être délivrées directement dans la zone d'intérêt, plusieurs lésions peuvent être traitées de manière différentes, permettant l'exclusion de la variabilité interindividuelle.

Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement) :

1- Remplacer : La douleur et l'inflammation sont des réactions intégrées de l'organisme entier impossible à reproduire *in vitro* dans leur intégralité. Néanmoins avant de réaliser ces expérimentations, les molécules thérapeutiques auront été testées sur culture cellulaire.

2- Réduire : En effet, la stratégie expérimentale repose sur des techniques non-invasives. L'utilisation de ces techniques 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.

3- Raffiner : De plus, lors des procédures pouvant entraîner une souffrance les animaux seront anesthésiés à l'isoflurane (gaz) ou avec un mélange xylazine/kétamine (injection intrapéritonéale).

La responsabilisation du manipulateur et le respect de l'animal nous conduisent à prendre en charge la prévention de la souffrance, notamment par l'application stricte de points-limites préalablement définis :

- perte de poids supérieure à 20% du poids initial
- grattage ou léchage anormal
- posture (voûte ou prostrée)
- aspect (amaigrissement, déshydratation, poils hérissés, salissures) - absence de toilettage
- anomalies de la respiration (rythme et mouvements)
- stéréotypies et hyperactivité (prurit, léchage)
- détection d'une anomalie (écoulement, plaies, inflammation)

Les animaux seront mis à mort à la fin de chaque procédure d'évaluation ou bien euthanasiés en cours d'expérimentation si l'état des animaux le justifie.

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

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 600 rats et 8440 souris (soit 9040 animaux) en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs).

Les souris sont hébergées dans des cages à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, en portoir ventilés (dans des cages d'une superficie de 900cm² pour les rats ou 500cm² pour les souris), 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 du sopalin sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute. Au cours de l'expérimentation, la personne en charge du développement technique réalisera le suivi du poids, évaluera la consistance des féces et la présence de sang dans les féces détectée par le test Hemocult II®.

17138 Dans un contexte général de changements globaux, nous manquons de connaissances sur les mécanismes au travers desquels ces changements affectent les individus, les populations et la biodiversité. L'objectif du projet est de pallier ces lacunes sur deux questions d'importance majeure: les effets du changement climatique et de la pollution sur les écosystèmes marins antarctique et subantarctique. Pour cela, nous allons étudier trois espèces d'oiseaux marins : une espèce se reproduisant en Antarctique, le pétrel des neiges, et deux espèces subantarctiques, le pétrel bleu et le prion de Belcher. En tant que prédateurs du haut du réseau trophique, les oiseaux marins sont en effet de bons indicateurs des changements des écosystèmes marins qui sont difficiles à mesurer directement.

Le projet s'intéressera lors de plusieurs saisons de reproduction aux caractéristiques des voyages alimentaires en mer, à la position trophique des individus et au niveau de pollution des oiseaux.

Pour les pétrels des neiges, 60 individus adultes par an seront capturés, pesés, équipés de GPS miniaturisés (attachés de façon non permanente et récupérés) puis relâchés, au cours de 5 années consécutives. A l'issue de leur voyage alimentaire en mer les oiseaux seront déséquipés, pesés, échantillonnés (sang et plumes) et relâchés. Les échantillons biologiques seront utilisés pour doser les marqueurs trophiques et mesurer la longueur des télomères.

Pour les pétrels bleus et les prions de Belcher, 30 individus adultes par an de chaque espèce seront capturés, pesés, échantillonnés (sang, plume, contenu stomacal) puis relâchés au cours de 2 années. Les contenus stomacaux seront utilisés pour quantifier la charge en particules de plastiques dans l'estomac et pour doser les niveaux de polluants liés au plastique dans les huiles stomacales. Le contenu stomacal sera obtenu à l'aide de la technique du lavage stomacal à l'eau, méthode la moins invasive pour récolter l'intégralité des contenus. Les échantillons de sang et de plume seront utilisés pour doser les marqueurs trophiques et sexer les individus. Pour chaque espèce parmi les 30 individus manipulés, 20 seront équipés d'un GPS miniaturisé pendant l'élevage du poussin pour un seul voyage alimentaire en mer. Pour ces 20 individus de chaque espèce, le contenu stomacal, le sang et les plumes seront recueillis lors du retour de l'oiseau au nid. Pour toutes les espèces, les individus seront capturés directement à la main sur leur nid ceux-ci ne fuyant pas à l'approche de l'humain.

Le nombre total maximum d'individus manipulés sera de 420.

Mesures pour respecter la règle des 3R :

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer les espèces cibles du projet, puisqu'il s'agit d'études spécifiques sur l'impact des changements climatiques et des polluants en milieu naturel sur des espèces d'oiseaux marins sauvages de l'océan Austral.

Réduire : Le nombre maximal d'individus échantillonnés est un compromis entre faisabilité sur le terrain et représentativité des changements observés (nécessité statistique). Il est également basé sur les résultats d'études précédentes.

Raffiner : Afin de réduire au minimum le stress infligé aux individus, toutes les précautions déjà connues seront scrupuleusement suivies en se basant sur les connaissances précises des espèces étudiées sur le long terme. Les oiseaux sont manipulés par des opérateurs formés et expérimentés et le temps de chaque manipulation est réduit au maximum afin de limiter le stress dû à la capture et aux manipulations.

17139 L'interaction entre individus sociaux, tant l'animal que l'homme qui cohabitent est essentielle à leur survie et bien-être. Alors que ces interactions peuvent transférer des informations positives, elles peuvent aussi faciliter l'échange de signaux négatifs. Dans des conditions psychologiques difficiles, la réponse d'un individu aux signaux sociaux peut aussi être altérée. Par exemple, l'expérience répétée d'un trauma vécu ou témoigné peut conduire à un état de stress sévère. Ceci pourrait élever l'anxiété et réduire les interactions sociales tels qu'il est rapporté chez des patients atteints de troubles neuropsychiatriques liés au stress (dépression...).

Dans ce projet innovant et multidisciplinaire, nous étudierons un état pathologique induit par le stress dans un modèle animal, en utilisant des outils de mesures comportementaux, physiologiques, cellulaires et moléculaires. Pour cela, nous proposons un paradigme de stress d'observation chez la souris qui permettra de mesurer l'impact d'un stress social tant sur le démonstrateur que l'observateur d'une expérience stressante.

Remplacer:

Nous avons effectué une recherche approfondie sur Pubmed et Google Scholar (période 2009-2020) afin de nous assurer de l'inexistence d'approches alternatives *in vitro* qui pourraient être utilisées pour reproduire l'interaction entre le stress social et le comportement. Cette recherche n'a pas identifié de solution *in vitro* alternative conservant les systèmes de communication multicellulaires, nécessaires pour ce projet. Nous étudierons des modèles génétiques murins caractérisés pour leurs similitudes génétiques et physiologiques aux corrélats de pathologies humaines.

Réduire: Tout les modèles seront croisés dans une souche génétique sensible au stress selon des études précédentes.

L'objet de cette application concerne l'utilisation de 616 souris sauvages et génétiquement modifiées réparties en 48 groupes expérimentaux et contrôles. Des tests statistiques nous permettront de réduire le nombre d'animaux. Le design expérimental permettra en simultanée d'étudier 2 souris avec une expérience qualitative différente du stress, le démonstrateur et l'observateur. Ceci réduira le nombre d'animaux nécessaires et raffine la question de la transmission de l'expérience du stress social.

Raffiner: La réalisation du projet concerne 48 groupes expérimentaux et contrôles divisés en 7 cohortes d'animaux sauvages ou transgéniques déjà prouvés comme modèle d'étude de la réponse au stress. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit grâce à une approche longitudinale rationnelle de plusieurs paramètres sur les mêmes animaux pour en limiter le nombre sans compromettre la puissance statistique des analyses. Plusieurs tests se feront sur le même animal avant et après le stress pour mesurer l'impact sur le comportement. Le raffinement implique aussi un hébergement dans un environnement enrichi (copeaux, igloo et coton dans la cage).

Nous utiliserons des approches complémentaires sont envisagées : le stress d'observation, la photométrie, l'optogénétique et modèles transgéniques. Une grille de points limites améliorera l'évaluation des paramètres.

Nous anticipons que les animaux témoignant le stress social exprimeront plus de peur, d'anxiété, de dépression et moins d'interactions sociales. Nous nous intéresserons en particulier aux individus les plus sensibles et les moins sensibles à l'observation de la peur. Nous chercherons à prédire les comportements dans l'analyse de l'activation des neurones de certaines régions du cerveau codant pour l'anxiété, le plaisir. Enfin activer ou bloquer ces neurones en temps réel par des outils génétiques devraient déterminer la relation cause à effet entre déficit comportemental et activité neuronale.

17140 Les cancers ont causé 9,6 millions de décès en 2018 et un Homme sur 5 va développer un cancer au cours de sa vie. Les thérapies conventionnelles comme la chimiothérapie ou la radiothérapie conservent un taux de rechute élevé plaçant les cancers comme deuxième cause de mortalité dans le monde. C'est pourquoi la recherche se tourne aujourd'hui vers la thérapie génique qui consiste à introduire du matériel génétique dans des cellules pour soigner la maladie. En effet, en 2018, environ deux tiers des essais cliniques en thérapie génique étaient attribués au traitement de divers types de cancers.

Pour cela, d'innombrables mutations génétiques ont été identifiées comme étant impliquées dans les cancers et font l'objet de nombreuses recherches. Malgré leur fort potentiel, les approches de thérapie génique dans le traitement de nombreuses maladies se heurtent aujourd'hui à une limitation majeure : le manque de porteurs de gènes sûrs et efficaces. Par définition, un système de délivrance (vecteur) est un système porteur capable d'encapsuler et de délivrer du matériel génétique exogène au sein de cellules spécifiques.

C'est sur ce constat qu'est née l'idée originale de développer de nouveaux vecteurs pour de la recherche appliquée et ainsi formuler des nanoparticules peptidiques pour la délivrance de différents oligonucléotides, comme les acides nucléiques, permettant d'activer ou d'inactiver certains gènes. La non toxicité des nanoparticules (NPs) a été démontrée lors d'études *in vitro*. L'étude préclinique chez l'animal permettra d'une part de tester la toxicité des NPs *in vivo* mais aussi de tester l'efficacité de celles-ci sur un modèle de tumeur cancéreuse chez le rongeur et ainsi trouver un gène cible. Les résultats attendus sont la diminution de la taille des tumeurs après traitement sans aucune toxicité induite ce qui n'est pas le cas des vecteurs actuellement utilisés.

L'étude sera réalisée plusieurs fois afin de tester différents vecteurs et différentes cibles, soit 760 animaux au total dont le nombre sera partagé entre la souris et le rat afin d'avoir 2 modèles animaux différents. Les animaux seront immunodéprimés pour éviter le rejet des tumeurs induites. Chaque étude comportera une première partie avec l'induction des tumeurs (xenogreffe) grâce à une injection sous-cutanée de différentes suspensions de cellules cancéreuses, selon le type de cancer étudié. La seconde partie comportera l'injection du traitement une fois par semaine directement dans la tumeur ou par injection intraveineuse. Le suivi de la taille des tumeurs et du poids des animaux pour alerter de

toute toxicité sera réalisé pendant 6 semaines. Des prélèvements sanguins seront également réalisés pour doser l'acide nucléique. Tous les animaux seront euthanasiés après 6 semaines de traitement pour faire des analyses histologiques.

La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respectée.

« Remplacer » : les études préliminaires *in vitro* ont permis de montrer la non toxicité de notre système mais celle-ci doit également être évaluée sur un organisme entier avant toute étude clinique. De plus, les modèles *in vitro* ou *ex-vivo* ne représentent pas aujourd'hui la complexité d'un environnement tumoral chez l'individu (vascularisation, inflammation.).

« Réduire » : nous utiliserons le nombre d'animaux minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques soit 760 animaux sur une durée de 5 ans. Des études préliminaires *in vitro* ont déjà été réalisées afin de réduire le nombre de molécules à tester ainsi que la dose, ce qui permet de réduire le nombre de groupe utilisant des animaux. Une étude préliminaire sur petit groupe nous permettra de mettre en place le modèle de tumeur avec un suivi dans le temps afin d'éviter des complications par la suite pendant l'étude sur des grosses cohortes d'animaux recevant le traitement.

« Raffiner » : la souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par l'utilisation de médicaments antalgiques, d'anesthésiques gazeux ou de crèmes anesthésiantes locales. Une étude des comportements sera réalisée de façon quotidienne et tout au long du protocole impliquant également la notion de points limites prédéterminés comme l'apparition d'une angoisse ou d'un inconfort trop important de l'animal, une taille de tumeur trop importante ou l'apparition de nécrose tumorale. Nous attacherons une importance majeure au raffinement des conditions d'hébergement et de soin. Les animaux seront hébergés en portoir ventilé à pression positive. Pour éviter les contaminations, le matériel d'hébergement sera stérile. Les cages transparentes permettront aux animaux de garder un contact visuel avec leurs congénères. L'enrichissement du milieu sera réalisé par l'ajout de petites plateformes leur permettant de grimper ou de se cacher. Toutes les manipulations seront réalisées sous poste de sécurité microbiologique PSM II.

17141 La prise en charge de patients en état de détresse respiratoire aiguë pouvant conduire au décès du malade est une situation fréquemment rencontrée par les médecins réanimateurs et urgentistes. L'existence d'un épanchement pleural important (liquide autour du poumon) ou d'un pneumothorax (air autour du poumon) peut être à l'origine de ces situations aiguës qui nécessitent une prise en charge urgente. Le drainage thoracique qui consiste à introduire un drain dans la cavité pleurale par un abord cutané latéral après incision de la paroi thoracique est un geste d'urgence qui doit être maîtrisé par tous les médecins confrontés à ces situations d'urgence. L'acquisition de ces compétences est un impératif en terme de formation afin de garantir une prise en charge optimale des patients. La maîtrise du geste de drainage nécessite de réaliser cette procédure à de multiples reprises et la simulation sur l'animal permet un apprentissage dans des conditions très proches de la réalité avant de réaliser ce geste sur l'humain.

Le modèle porcin est le plus proche anatomiquement pour simuler le geste de drainage thoracique. En effet, il permet de mettre en évidence les interactions cœur-poumon lors du drainage thoracique. Plusieurs techniques doivent être apprises en fonction de la morphologie du patient et du type d'épanchement pleural pour réaliser le drainage thoracique : technique chirurgicale, technique à mandrin exsufflation à l'aiguille, technique de Seldinger sur guide. Toutes ces techniques sont enseignées lors des sessions de formation.

Quatre porcs large-white, permettant de former 20 médecins, sont anesthésiés et ventilés mécaniquement par session. A raison d'une session par an, cela représente un total de 20 animaux sur 5 ans. Cette formation par simulation sur l'animal s'inscrit dans le cadre d'un diplôme inter universitaire de trauma sévère, formation qualifiante pour les médecins urgentistes et réanimateurs.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en oeuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) Cette formation par simulation "*in vivo*" est indispensable avant de pratiquer soi-même un geste sur un patient. Plusieurs procédés de simulation chirurgicale ont déjà été proposés (modèles inertes, simulateurs) mais l'absence de réactions physiologiques ne permet pas une simulation réaliste. De plus, ces animaux sont également utilisés pour la formation de ces mêmes médecins à

l'échographie pleuro-pulmonaire qui est une aide au diagnostic de pathologies pleuro-pulmonaires et permet de diminuer le nombre de radiographies thoraciques en service et par conséquent de diminuer l'irradiation des patients.

(Réduire) Le nombre d'animaux est évalué en tenant compte du nombre de sessions de formation prévisibles, répondant à la demande et fonction du nombre d'inscrits. Il répond également aux conditions d'accès aux blocs opératoires limitées à 5 personnes hors formateurs pour des raisons de sécurité.

(Raffiner) La souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée du protocole. Aucun animal ne sera réveillé, l'euthanasie étant réalisée sous anesthésie générale.

Le personnel impliqué dans le projet possède toutes les compétences nécessaires, d'un point de vue technique notamment puisque les formateurs sont des médecins confirmés habilités à l'expérimentation animale ("Conception et réalisation des procédures expérimentales"), et qui seront assistés par une personne du plateau technique ayant suivi un module de formation complémentaire pour la chirurgie expérimentale chez le porc.

17142 La septicémie ou sepsis est une infection grave, se propageant dans l'organisme par voie sanguine à partir d'un foyer infectieux initial (péritonite, infection urinaire, brûlure de la peau, etc...). Le plus souvent d'origine bactérienne, elle peut aussi être provoquée par des virus, des champignons ou des parasites. Ces micro-organismes vont se multiplier et se propager ensuite dans l'organisme. Cette « invasion », en absence de traitement, peut entraîner une défaillance/un dysfonctionnement d'organes comme le foie, les reins, les poumons ou une coagulation du sang dans les vaisseaux, potentiellement mortelle.

La septicémie affecte principalement des individus déjà fragilisés, les nouveau-nés et les personnes âgées. Au niveau international, on estime à 6 millions le nombre de décès par an des suites d'une septicémie. En France, ce nombre serait de 30000.

Les symptômes et l'évolution de cette pathologie sont très variables selon les individus allant dans certains cas à un sepsis sans symptômes guérissant spontanément à une cascade massive de réactions inflammatoires caractérisées par de la fièvre élevée, une fatigue intense, une chute de la pression artérielle, une augmentation de la fréquence cardiaque et respiratoire pouvant être fatale pour le patient.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur l'insuffisance rénale (quantification de marqueurs biochimiques, mesure de la vitesse de filtration du sang par le rein, histologie du rein.) suite à une septicémie induite par une lésion du caecum (LCP) chez la souris. Actuellement, les méthodes alternatives *in vitro* et *ex vivo* permettant une telle évaluation dans son ensemble n'existent pas : c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour mieux comprendre et traiter ces dysfonctions suite à une septicémie.

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 à l'espèce sera rajouté aux animaux (des igloos en polycarbonate, carrés de coton, aspen brick, ...). Une attention particulière sera apportée à la surveillance des animaux et à leur suivi lors de l'induction de la septicémie puisqu'il s'agit d'une infection grave pouvant aller jusqu'à la mort des animaux. En effet, selon la position de la ligature du caecum, des atteintes plus ou moins sévères seront observées. Six à 12 heures après l'intervention chirurgicale, les souris présenteront tous les symptômes d'une septicémie à savoir ; une léthargie, une augmentation de la température corporelle (fièvre), une piloérection, une diarrhée, des recroquevillements et des malaises. Si une souris était atteinte de septicémie sévère (immobilité et importante chute de la température corporelle), elle serait euthanasiée afin d'éviter des douleurs et des souffrances prolongées.

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. Les animaux recevront après l'intervention chirurgicale une administration d'analgésique ainsi que du sérum physiologique pré-chauffé (1 mL en sous-cutané).

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sur 5 ans sera de 440 souris. En raison de 10 animaux par groupe pour l'évaluation de l'effet de candidats médicaments (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. La mesure de la filtration glomérulaire transdermale est une méthode non-invasive qui permettra de suivre au cours du temps, sur un même animal, l'effet des candidats médicaments.

Une des procédures de ce projet est classée comme une procédure sévère, ce qui implique qu'à la fin de ce projet une évaluation rétrospective, par le comité d'éthique, sera réalisée.

17143 Les déformations du squelette facial causé par des apparitions de défauts osseux sont fréquemment rencontrées chez l'homme. Ces défauts osseux peuvent être causés par diverses origines comme par des traumatismes à haute énergie (accident, blessure liée à la pratique d'un sport, accident du travail, etc.), des malformations congénitales ou encore des maladies particulières telles que les maladies parodontales. Ces pathologies affectent les proportions anatomiques des patients et peuvent compromettre les systèmes stomatognathique, visuel et olfactif ainsi que les fonctions de la mandibule. Dans la pratique clinique, afin de remédier à ces problématiques, des chirurgies de reconstructions maxillo-faciales à l'aide de greffes osseuses, de substitut osseux ou encore de dispositifs médicaux résorbables ou non résorbables (mesh, vis, résines...) sont généralement réalisées.

Comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, règlement 2017/745, 21 CFR 820...), il est impératif de démontrer la sécurité, l'efficacité ainsi que la performance des dispositifs médicaux afin de réduire au minimum le risque pour le patient. A l'heure actuelle, seuls les modèles d'études *in vivo* permettent de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux dispositifs médicaux implantables et d'en tester intégralement l'efficacité et la tolérance locale. Sans méthode alternative, l'expérimentation animale est donc nécessaire dans le cadre de cette démonstration.

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer *in vivo* la performance et la tolérance locale des produits de comblements osseux (dispositifs médicaux) utilisés en chirurgies de reconstructions maxillo-faciales. Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent d'assurer ces évaluations sur des modèles animaux, l'espèce canine est un des modèles largement décrit dans la littérature en chirurgie dentaire.

Lors de ce projet, l'imagerie médicale sera utilisée (scanner à rayons X ou scanner CT) afin de suivre l'évolution des produits de comblement osseux au cours du temps. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement une anesthésie) et ne nécessitent pas de sacrifice d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire et s'inscrivent donc dans une démarche éthique de réduction du nombre d'animaux.

Dans le cadre de ce projet, le nombre d'animaux utilisé 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). Pour mener à bien l'évaluation de la performance de chaque dispositif médical pour un seul délai d'implantation, un maximum de 12 sites d'implantation peut être nécessaire. Pour ce projet, l'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur cinq ans est donc de 380 chiens (à raison de 10 études de performance comprenant au maximum 36 individus répartis sur 3 délais d'implantation et 10 études de screening comprenant 2 individus).

Dans le cadre des études couvertes par ce projet, chaque animal bénéficiera 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 des études. Quelles que soient les études, la douleur sera rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/algésie). De plus, des critères d'interruption ou « points limites » seront définis avant chaque démarrage d'étude. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et de prévenir de l'apparition de ces points limites permettant ainsi de prendre des mesures appropriées le plus rapidement possible.

Afin de mener à bien l'ensemble des études qui composent ce projet une collaboration avec d'autres Etablissements Utilisateurs (EU) sera réalisée. Ces EU partenaire conduiront des phases telles que l'hébergement, les chirurgies, les soins, les euthanasies, ... et feront appel à nous pour notre expertise en imagerie médicale pour la réalisation de scanners.

Ce projet pourra permettre alors par le biais de l'expérimentation animale de démontrer la sécurité et la performance de produits de comblement osseux par leurs évaluations au cours du temps suivant trois principales méthodes (non-exhaustives) :

- L'analyse par imagerie médicale
- L'observation macroscopique
- L'analyse histopathologique et/ou immunohistochimique

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles formulations de produits de complements osseux pour la chirurgie reconstructrice maxillo-faciale.

17144 L'élevage porcin conventionnel est conduit en bandes successives dans lesquelles toutes les femelles sont inséminées, mettent bas et sont sevrées le même jour. Pour créer les bandes, les éleveurs réalisent une synchronisation des cycles de reproduction des femelles en distribuant dans l'alimentation pendant 18 jours un analogue de progestérone (hormone de synthèse). Cinq jours après l'arrêt de la distribution, les femelles viennent spontanément en chaleur et sont donc inséminées en même temps. Cette pratique présente un intérêt pour organiser le travail mais aussi pour constituer des lots homogènes de porcelets (même âge, même poids). Toutefois, l'utilisation d'hormones de synthèse pour la conduite des élevages a des impacts négatifs connus sur l'environnement et la santé humaine. De plus, le cahier des charges pour l'élevage biologique interdit d'avoir recours aux hormones de synthèse.

Nous avons donc entamé un programme d'exploration de la présence de progestérone à l'état naturel dans un certain nombre de plantes, et nous avons identifié une plante de nos campagnes contenant de la progestérone et pouvant être utilisée pour une distribution orale. Nous souhaitons tester l'effet de cette plante candidate en élevage porcin et remplacer la distribution des hormones de synthèse par la distribution directe de cette plante dans l'alimentation.

Le programme consiste donc à distribuer cette plante séchée à de jeunes truies et à mesurer les concentrations sanguines de progestérone afin de vérifier que la progestérone apportée par la plante se retrouve dans la circulation sanguine. Nous utiliserons 9 cochettes ovariectomisées, soit 3 groupes de 3 animaux en carré latin : un groupe avec distribution de plante, un groupe sans distribution, un groupe sans distribution avec apport de progestérone de synthèse par voie orale. Ainsi, 3 séries seront réalisées, chaque femelle intégrant successivement les 3 groupes à tour de rôle, avec une semaine d'intervalle. Dans chacun des 3 groupes, 7 prises de sang seront réalisées dans la veine jugulaire de chaque femelle lors d'une distribution d'eau sucrée permettant l'immobilisation, dans la mesure du possible, ce qui permet des prélèvements sans contention et sans stress pour l'animal. Au total, chaque femelle aura donc 3 séries de 7 prises de sang espacées d'une semaine minimum.

La règle des 3R a été prise en compte :

-Remplacement : l'utilisation de l'animal est nécessaire pour documenter les réponses hormonales.

-Réduction : Un calcul du nombre de femelles nécessaires a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'animaux à inclure dans le projet. Le nombre et la fréquence des prises de sang pour le suivi hormonal a été réduit au minimum.

Par ailleurs des collectes de salive, non invasives et non stressantes (simple présentation d'un coton à mâchouiller) seront réalisées, afin de mettre au point des dosages hormonaux dans la salive qui remplaceront à terme les dosages sanguins.

-Raffinement : Pour réduire au maximum la souffrance de l'animal, des antalgiques seront systématiquement administrés en pré et en post opératoire. Les prélèvements de sang sont réalisés dans la veine jugulaire lors d'une distribution d'eau sucrée permettant l'immobilisation, ce qui permet des prélèvements sans contention et sans stress pour l'animal. Les conditions d'hébergement sont raffinées par la mise à disposition d'une litière constituée d'une couche épaisse de paille, permettant une activité de fouille et de comportement exploratoire tel que préconisé dans le cadre des recommandations européennes (rapport EFSA).

17145 Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche sur le diabète, pathologie qui se caractérise par une élévation anormale du taux de glucose dans le sang, et qui touche plus de 300 millions de personnes dans le monde, soit 6,6 % de la population adulte mondiale, d'après la Fédération Internationale du diabète. En particulier le diabète de type 2 (DT2), caractérisé par une résistance des tissus (muscles, foie, tissus adipeux) à l'insuline associée à un défaut de sécrétion de l'insuline par le pancréas, est une maladie dont le principal facteur de risque est l'obésité, et dont la phase de mise en place ou "prédiabète" peut prendre plusieurs années. Ainsi, il y aurait un grand intérêt à pouvoir dépister les personnes à risque parmi une population donnée, par exemple les adultes en surpoids, et à leur proposer des mesures prophylactiques afin d'éviter ou de repousser la survenue du diabète. Parmi les biomarqueurs potentiels de la mise en place du DT2 figure la sphingomyélinase alcaline intestinale, également appelée ENPP7. Les taux plasmatiques de cette enzyme sont corrélés avec la détérioration de l'homéostasie glucidique. Cette étude menée chez la souris, modèle animal particulièrement pertinent pour les maladies métaboliques, a pour but d'évaluer le rôle causal d'ENPP7 dans la détérioration de l'équilibre glycémique et la survenue du DT2. Nous utiliserons une approche de "perte de fonction" de la protéine grâce à des souris présentant une absence du gène codant pour ENPP7 (ENPP7 total KO), ainsi qu'une approche, complémentaire, de "gain de fonction" en injectant des souris non mutées avec un vecteur viral de sur-expression d'ENPP7. Les souris seront ensuite étudiées sous régime normal (RC) ou hyperlipidique (HFD) afin de caractériser leur équilibre glycémique et leur sensibilité à l'insuline. Le nombre total sera de 100 animaux, ce qui constitue le plus petit nombre permettant d'effectuer des tests statistiques, et permet de respecter les exigences éthiques de "Réduction" du nombre d'animaux. Cette étude ne peut être remplacée par d'autres moyens car l'étude de la sensibilité à l'insuline des tissus et l'impact sur la glycémie ne peut se faire qu'*in vivo*, et les souris sont un excellent modèle d'étude de l'homéostasie glucidique (physiologie et pathophysiologie très similaires à l'Homme). Cette étude sera menée dans le souci de respecter le plus possible le bien-être animal (règle des 3R, raffinement des procédures et amélioration de leur environnement). Ainsi les animaux seront laissés en groupe de 4 par cage, un nid végétal leur sera proposé ainsi que des morceaux de bois (pour permettre l'usure des dents) et un cylindre de carton.

Nous attendons des résultats qui valident le rôle d'ENPP7 sur l'augmentation de la résistance à l'insuline et le développement du diabète : les souris KO devraient être protégées tandis que les souris sur-exprimant ENPP7 développeront des dysfonctionnements de l'homéostasie énergétique plus rapidement. Ainsi ENPP7 deviendrait une cible thérapeutique importante, qu'il conviendrait d'inhiber pour freiner le développement du DT2.

17146 Les motoneurons qui résident dans la moelle épinière constituent le relai final entre le système nerveux central et le muscle squelettique, responsable du mouvement. Au cours de leur différenciation, les motoneurons émettent des axones qui sortent de la moelle épinière pour suivre une trajectoire stéréotypée pour atteindre leur cible musculaire. Ce processus est orchestré par tout un répertoire de molécules présent dans l'environnement des axones. Après lésion des nerfs moteurs, l'environnement va à nouveau servir pour le guidage des nerfs afin qu'ils puissent retourner vers leur cible musculaire initiale.

L'importance de l'environnement au cours de la régénération des nerfs moteurs sera étudiée chez des jeunes alevins de poissons zèbres dont un gène d'une molécule de guidage a été muté. Cette mutation ne devrait pas induire de phénotype dommageable permettant l'élevage des poissons. Afin de visualiser les nerfs moteurs et les cellules impliquées dans le processus de régénération, ces poissons auront préalablement été croisés avec 5 lignées transgéniques fluorescentes. Les nerfs sont lésés par ablation laser chez les jeunes alevins, procédure qui n'induit pas de blessure chez l'animal. Le processus de régénération sera ensuite suivi *in vivo* par fluorescence, de manière non invasive.

Un total de 3260 poissons mutés et transgéniques sera utilisé sur une période de 5 ans en incluant les géniteurs (2880) nécessaires à l'obtention des alevins subissant l'ablation laser.

Remplacement: Le processus de régénération des nerfs intervient dans un environnement complexe qu'il n'est pas possible de reproduire *in vitro*. Nous utiliserons le poisson zèbre plutôt que le modèle de

la souris déjà établi car il permet de visualiser *in vivo* le processus de régénération par fluorescence de manière non invasive.

Réduction: de plus, sa capacité de fécondation externe permet aussi d'obtenir facilement des embryons sans mise à mort des parents et donc de réduire le nombre d'animaux à utiliser.

Raffinement : des points limites adaptées à la procédure et suffisamment prédictifs et précoces ont été établis pour éviter tout mal être de l'animal.

17147 Les neurones sont responsables de la réception et de la transmission des informations dans le cerveau. L'excitabilité des neurones et le maintien des signaux électriques qui passent aux axones neuronaux dépendent considérablement de l'expression et de l'organisation de complexes protéiques situés dans un compartiment spécifique du neurone appelé : le segment initial de l'axone (AIS). Toute défaillance de propagation des signaux électriques peut entraîner des désordres psychiatriques majeurs comme le trouble bipolaire, l'épilepsie ou la schizophrénie.

Prickle2 et Scribble1 sont deux protéines exprimées dans la région de l'AIS. Ce projet vise à caractériser deux lignées de souris transgéniques créée récemment et présentant une délétion de ces gènes uniquement dans le cerveau afin d'identifier la nature exacte de leurs éventuels troubles comportementaux. Ce sont les lignées NEX*Prickle2*Scribble1 et EMX*Prickle2*Scribble1 qui ne présentent aucun phénotype dommageable.

Nous étudierons premièrement les comportements émotionnels, cognitifs et sociaux en utilisant des tests non invasifs et faiblement anxiogène pour les animaux. Nous testerons l'activité locomotrice, la réaction face à la nouveauté, le niveau d'anxiété ou de résignation naturelle, le comportement social et la mémoire. Des études complémentaires utilisant d'autres tests comportementaux plus spécifiques seront réalisées uniquement si des troubles sont détectés en première étude.

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. Cependant, il est important, une fois nos hypothèses testées *in vitro*, de vérifier leur véracité sur des modèles animaux en effectuant des tests comportementaux.

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 210 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 150 animaux par groupe est nécessaire pour notre étude. Nous réduisons le nombre de souris utilisé en utilisant les mêmes animaux pour plusieurs tests comportementaux.

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 avec un nid végétal, surveillés régulièrement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place avec des mesures de soulagement (réhydratation, réchauffement, nourriture humidifiée ou sous forme de gel).

17148 Le hamster commun (*Cricetus cricetus*), présent en France uniquement dans les départements du Bas-Rhin et du Haut-Rhin, est une espèce patrimoniale des plaines agricoles d'Alsace. Autrefois très abondante (présence de terriers sur 329 communes en 1974), elle était considérée comme une espèce nuisible. Depuis les années 70, le déclin dramatique de l'espèce (terriers uniquement présents sur 56 communes en 2000 et 21 en 2017) a alerté sur l'état de santé général de la biodiversité de la plaine d'Alsace. Au total, les effectifs de l'espèce ont décliné de 94% dans l'ensemble de son aire de répartition française entre 1972 et 2012.

Depuis le début des années 2000, la stratégie française de restauration des populations de hamsters repose prioritairement sur l'amélioration de l'habitat de l'espèce. Cependant, en raison des très faibles effectifs présents à l'état sauvage, cette stratégie est complétée par une mesure couramment utilisée en biologie de la conservation: le renforcement des populations sauvages par la réintroduction

d'animaux issus d'élevages dans des secteurs écologiquement favorables. Depuis 2012, un des objectifs de cette action de renforcement est le maintien d'une population sauvage viable sur le long terme. Cependant, le succès de cette méthode est souvent mitigé en raison de la mortalité élevée, due principalement à une très forte pression de prédation, qui s'exerce sur les hamsters issus d'élevage et n'ayant jamais vécu dans un environnement naturel.

De 2010 à 2011, une première expérimentation avait été menée visant à limiter la prédation dans les parcelles de lâcher. L'évaluation de mesures de protection (pose de clôtures électriques anti-prédation terrestre et non récolte des céréales à pailles) par le suivi individuel d'animaux d'élevage a permis de diminuer cette sensibilité à la prédation (paramètres extrinsèques). Ainsi la présence des clôtures électriques permet d'accroître significativement (multiplication par 10 à 15) la durée de vie des animaux d'élevage lâchés tout en permettant la reproduction in situ d'au moins 40 à 50% des femelles réintroduites. Mais l'évaluation des relâchers ces dernières années par des comptages de terriers en septembre semble indiquer que tous les paramètres ne sont pas encore optimisés.

L'objectif de cette étude vise à identifier des paramètres intrinsèques aux individus nés en captivité (capacités des animaux à s'adapter à un nouvel environnement, à réagir face à un risque de prédation, etc.), pouvant améliorer leur adaptation en milieu naturel lors des renforcements des populations. Les tests mis en place auront pour but d'évaluer l'efficacité d'une période préalable d'acclimatation dans un enclos extérieur sur la survie et la reproduction in natura de ces hamsters nés et élevés en captivité. En parallèle, cette expérience visera également à évaluer l'effet de l'âge des hamsters au moment des lâchers sur leur capacité à survivre dans le milieu naturel.

Afin d'évaluer le comportement pré-lâcher des hamsters, un test standardisé pouvant engendrer un stress comparable à celui induit par une confrontation à un risque de prédation (présentation d'un renard naturalisé) sera réalisé pour tous les individus de cette expérimentation. Les hamsters seront ensuite implantés avec des émetteurs intra-abdominaux pour le suivi télémétrique et répartis en 3 groupes avant d'être libérés sur des parcelles agricoles conventionnées pour les renforcements (parcelles clôturées, non récoltées, et sur lesquelles seront implantés un couvert végétal diversifié afin d'assurer la disponibilité sur site d'une ressource alimentaire variée).

Cent cinquante individus seront utilisés au total sur la durée de l'étude, répartis chaque année de lâchers en 3 groupes de 15 à 20 individus au plus :

- un groupe contrôle, constitué de hamsters adultes (environ 1 an) élevés dans les conditions classiques de l'animalerie ;
- un groupe enclos (groupe traitement 1), constitué de hamsters adultes relâchés pour une période de 2 semaines dans un enclos extérieur pluri-individuels et protégé des prédateurs terrestres et aériens ;
- un groupe de juvéniles (groupe traitement 2), constitué de hamsters juvéniles sevrés (environ 3 mois) élevés dans les conditions classiques de l'animalerie.

Après les lâchers en juin, le suivi télémétrique des individus permettra d'étudier le déplacement et la survie des hamsters marqués. Couplé à un dispositif de pièges photographiques et de pièges à poils (permettant l'accès au génome des portées et à leur pédigrée), il deviendra possible d'estimer le taux de reproduction des femelles (nombre de portées et nombre minimum de jeunes par portées).

Cette étude ne pouvant être réalisée sur une autre espèce que le hamster commun, il n'a pas été possible de la remplacer comme préconisé par la règle des 3 R. Toutefois, l'effectif des individus testés a été réduit à son minimum. De plus, la procédure d'implantation sera réalisée sous anesthésie et analgésie. L'état de santé général des animaux après la chirurgie sera suivi quotidiennement en suivant une grille d'évaluation de la douleur. Ce suivi permettra de repérer rapidement tout animal en détresse et d'appliquer les points limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance. Enfin, d'autres procédures de raffinement ont été mises en place (l'enrichissement de la cage avec un petit tunnel en PVC, du papier et un morceau de bois à ronger et pour favoriser les comportements naturels de nidification par exemple. Manipulation limitant le stress, etc.) afin d'améliorer le bien-être des animaux utilisés dans le cadre de cette expérimentation.

17149 Le concept d'élevage à haute valeur environnementale devrait favoriser l'émergence de pratiques maximisant l'utilisation des ressources fourragères locales non concurrentes avec l'alimentation humaine, et limitant les intrants (achats d'aliments, fertilisants...). Ces pratiques impliquent l'acceptation d'un moindre contrôle de l'environnement et d'une part plus importante d'aléas, auxquels les animaux doivent s'adapter. Cette adaptation passe par la robustesse des animaux vis-à-vis des challenges rencontrés au cours de leur vie productive, et également par leur efficacité (capacité à produire plus avec les mêmes ressources ou à produire autant avec moins de ressources) sur des rations de valeur alimentaire variable et souvent faible. Pour favoriser/améliorer cette robustesse et/ou efficacité, une voie est la sélection génétique. Une autre voie est celle de l'environnement que l'individu expérimente, notamment durant les premières phases de sa vie. C'est l'interaction entre ces deux voies que le projet propose d'étudier, dans le contexte de l'élevage ovin conduit sur parcours. C'est un projet de recherche fondamentale et appliquée menée pour le bien-être des animaux et l'amélioration de leurs conditions de production. Il implique des procédures expérimentales légères.

En Europe, les ovins sont majoritairement élevés dans des zones défavorisées, notamment en France avec plus de 80% du cheptel concerné. Le parcours considéré ici fait partie de ces zones défavorisées. Il est caractérisé par une forte variabilité spatiotemporelle de la ressource alimentaire et des conditions climatiques, associée à de grands espaces ouverts impliquant des contraintes sociales, de relation à l'homme et d'utilisation de l'espace. L'objectif du projet est d'identifier et comprendre les mécanismes sous-jacents au développement des capacités adaptatives (notamment comportementales) des animaux, qui sont mobilisées dans ce type d'environnement, et qui participent à leur bien-être au pâturage. Seul l'animal dans son intégralité peut donc être utilisé pour y répondre.

L'originalité du projet repose sur : 1- une analyse de l'adaptation sur le plan comportemental, zootechnique, métabolique et sanitaire ; 2- sur une analyse sur le long-terme, en suivant les agnelles depuis leur naissance jusqu'au sevrage de leurs premiers agneaux deux ans plus tard ; et 3- la considération de deux types d'élevage contrastés dans le jeune âge qui font partie des pratiques d'élevage actuelles. Nous utiliserons 80 agnelles (*Ovis aries*) de race allaitante sur la durée du projet, d'avril 2021 à juin 2023. Un test comportemental sera également conduit sur leurs mères (entre 40 et 80 selon les modalités de naissances) en juillet 2021, après le sevrage des agnelles. Concernant les agnelles, quatre traitements seront considérés, correspondant au croisement de deux lignées génétiques sélectionnées sur l'efficacité alimentaire (+ et -) et de deux environnements précoces, appliqués de la naissance au sevrage. Le premier environnement correspond à la conduite en allaitement artificiel (AA) caractérisée par du lait artificiel, l'absence de modèle maternel et de congénères adultes, un élevage en bâtiment et une alimentation peu diversifiée. Le second correspond à l'élevage sur parcours caractérisé par un allaitement maternel (AM), la présence de la mère et de congénères adultes, un élevage en plein air et une alimentation diversifiée. Les quatre traitements sont donc : AA+, AA-, AM+ et AM-. Trois phases seront particulièrement suivies : la phase 1 de la naissance à environ 3 mois d'âge (jusqu'au sevrage des AM), qui correspond à l'application de l'environnement précoce (AA et AM). À l'issue de cette phase, toutes les agnelles entreront sur les parcelles expérimentales (sur parcours) et seront soumises aux mêmes conditions ; la phase 2, de 3 à environ 6 mois d'âge, qui correspond à la principale phase expérimentale où se dérouleront les tests comportementaux et une proportion plus importante des mesures et prélèvements ; et la phase 3, de 18 à 27 mois d'âge, lorsque les agnelles seront mises à la reproduction, en gestation puis lactation (première mise bas). Les agnelles rejoindront le troupeau allaitant du site après la phase 2, puis à la fin du projet.

Le suivi expérimental des animaux impliquera des tests comportementaux et des prélèvements de sang, de fèces et de contenu ruminal, afin de pouvoir analyser leur adaptation comportementale et physiologique, et les conséquences en termes de performances et de santé. Les tests comportementaux seront réalisés de façon à minimiser le temps d'isolement social (max 5-6 minutes). Les prélèvements seront réalisés par du personnel expérimenté et compétent, avec du matériel adapté à l'âge de l'animal. Les animaux seront observés pendant et après les procédures pour relever les signes éventuels d'inconfort et de douleur. Une assistance vétérinaire sera sollicitée si nécessaire. Le nombre de prélèvements sera limité au strict nécessaire pour assurer le suivi des effets des traitements, tout en minimisant la contrainte pour l'animal. En dehors des prélèvements, les animaux bénéficieront

d'un suivi étroit tout au long du projet permettant de suivre leur croissance, leur état sanitaire général (présence de diarrhées, écoulements nasal et oculaire, toux, boiterie...) et leur comportement (apathie par exemple), afin de pouvoir les traiter rapidement. Si nécessaire, un animal sera sorti du projet et rentré en bâtiment pour être soigné. Au moment spécifique de l'agnelage, les brebis sont ramenées en bâtiment pour 24h pour s'assurer de la prise de colostrum par les agneaux. Concernant spécifiquement les agnelles AA, plusieurs mesures seront prises pour faciliter l'alimentation et préserver leur santé : poids minimum de 2,5kg, distribution d'une dose supplémentaire de colostrum, contrôle de la température du lait, aide à l'apprentissage de l'allaitement artificiel, sevrage entre 45 et 60 jours pour éviter les problèmes digestifs. Sur le parcours, de nombreux arbustes (buis, genévriers...) permettront aux animaux de s'abriter des conditions climatiques défavorables. Le nombre d'animaux (20 par traitement) a été calculé sur la base du nombre nécessaire pour obtenir une réponse significative dans le cadre des tests comportementaux les plus contraignants statistiquement.

Les connaissances issues de ce projet participeront à comprendre les interactions / synergies / compromis entre efficacité et robustesse, et à adapter les pratiques (notamment dans le jeune âge) et les schémas de sélection, selon les objectifs, dans des systèmes d'élevage contraignants tels que celui considéré ici.

17150 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie se caractérise sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Ces symptômes ont été associés à une perte de neurones produisant la dopamine au niveau cérébral. Les traitements actuels visant à soulager ces symptômes ne sont pas optimaux. Le développement de nouveaux outils thérapeutiques est donc essentiel.

Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques, nous proposons la réalisation de modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson (MP) chez la souris qui permettent de reproduire les symptômes moteurs typiques de cette maladie ainsi que la perte de neurones dopaminergiques et d'évaluer les propriétés de nouvelles molécules sur différents modèles murins bien décrits dans la littérature.

Les modèles que nous utilisons permettent d'évaluer l'effet de composés pharmacologiques sur les composantes comportementales (l'amélioration des symptômes moteurs) et cellulaires (effet neuroprotecteur sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques) de la MP chez la souris.

Ces modèles sont générés dans le cadre d'une activité pré-clinique sur des composés thérapeutiques avec un nombre de 3 études par an, comprenant 100 souris par étude (soit un total de 1500 animaux sur 5 ans).

Ces modèles sont basés sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire via l'injection intracérébrale soit d'une neurotoxine, la 6-OHDA (lésion totale) soit d'un virus (lésion partielle).

Les approches mises en œuvre sont une chirurgie (stéréotaxie) peu douloureuse et l'administration chronique d'un traitement. Elles peuvent concerner des souris normales et des souris transgéniques. Le bénéfice attendu est une meilleure compréhension des effets d'un traitement expérimental chronique à différentes doses dans la MP mesurés grâce à différents tests comportementaux faisant appel au comportement moteur.

Notre activité de recherche pré-clinique nous amène à tester différents composés thérapeutiques sur ce modèle avec 3 études par an, comprenant 100 souris par étude. Dans le respect de la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 20 animaux par groupe soit 100 souris par étude incluant les groupes expérimentaux (4 doses différentes de composé) et leur contrôle. L'analyse des effets pharmacologiques sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Le remplacement par des modèles *in vitro* actuels ne permettrait pas de répondre à notre question. 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 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, 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. 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.

17151 Une étude importante basée sur le suivi de 120.000 personnes pendant plus de 30 ans a permis de montrer récemment une corrélation entre la prise régulière de boissons sucrées et le risque de mortalité par cause cardiovasculaire. Cependant, à ce jour, les mécanismes cellulaires sous-jacents aux effets délétères d'un stress hyperglycémique demeurent mal compris. L'hyperglycémie aiguë semble pouvoir être à l'origine de dysfonctions mitochondriales notamment caractérisées par une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau cellulaire, conduisant à l'établissement d'une situation de stress oxydant. A l'échelle du muscle cardiaque, ceci pourrait contribuer à l'établissement d'un phénotype plus sensible au stress et ainsi à une plus grande vulnérabilité du cœur à un syndrome ischémique. De plus, sachant qu'il existe une bio-communication étroite entre les cardiomyocytes et les artères coronaires, nous supposons un potentiel impact de la surproduction de ROS cardiomyocytaires sur la fonction vasculaire coronaire cardiaque.

L'ensemble de ces facteurs pourraient contribuer à expliquer que le niveau de glycémie lors de l'admission à l'hôpital de sujets non diabétiques soit un facteur prédictif de la sévérité des lésions d'ischémie-reperfusion. De plus, l'hyperglycémie semble être capable de limiter l'efficacité des stratégies de conditionnement cardiaque permettant normalement d'induire une cardioprotection et ainsi de limiter la sévérité des lésions de reperfusion.

Parmi les stratégies de cardioprotection efficace à la fois dans les modèles expérimentaux et chez l'homme, l'exercice physique est reconnu comme permettant de diminuer la taille de la zone nécrosée suite à un infarctus du myocarde, notamment via sa capacité à moduler la production de ROS et stimuler le métabolisme du monoxyde d'azote (NO). Cependant, à ce jour, l'impact de l'hyperglycémie aiguë sur la capacité de l'exercice physique à pré-conditionner l'organe cardiaque et à limiter les lésions au cours de l'infarctus reste mal décrit et les mécanismes sous-jacents non investigués. Ainsi, observer si un cœur soumis à une hyperglycémie aiguë est toujours conditionnable par l'exercice physique sera l'un des objectifs de ce projet. La compréhension des mécanismes sous-jacents devrait permettre de mieux appréhender les effets délétères de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion et ainsi potentiellement de faire émerger de nouvelles cibles de cardioprotection.

En résumé les objectifs de cette étude sont: (1) Evaluer l'impact de l'hyperglycémie aiguë sur la production de ROS mitochondriaux et cardiomyocytaires et son impact sur la fonction vasculaire coronaire ; (2) Observer si la cardioprotection par l'exercice physique est toujours efficace lorsque le muscle cardiaque a subi une situation transitoire d'hyperglycémie; et (3) Investiguer les mécanismes sous-jacents à cette modulation de la sensibilité du cœur à un syndrome d'ischémie-reperfusion (une attention toute particulière sera portée sur l'équilibre NO-ROS).

Pour cela, la fonction cardiaque de rats adultes, entraînés ou non, sera étudiée via un système de cœur-isolé, perfusé de manière transitoire (45min) avec une solution normoglycémique ou hyperglycémique de manière à standardiser les conditions de fonctionnement de cet organe et ainsi limiter le nombre d'animaux à utiliser. Les fonctions cardiaque et coronaire basales, ainsi qu'au cours d'une ischémie-reperfusion seront analysées dans ces différentes conditions (fonction cardiaque et perfusion coronaire mais aussi en cuve à organe isolé (fonction coronaire).

Afin d'étudier l'effet d'une hyperglycémie aiguë sur les mécanismes cellulaires et moléculaires cardiaques, le cœur préalablement perfusé sera utilisé pour des études sur mitochondries isolées, cardiomyocytes isolés, des analyses tissulaires ou encore des Western Blot.

Au total 224 rats seront nécessaires durant cette étude afin de disposer de l'effectif minimum permettant de mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres étudiés.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 R :

Remplacement : Il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution *in vitro* pour étudier l'effet d'un exercice physique sur la fonction cardio-vasculaire lors d'un stress hyperglycémique. Le rat est un modèle de choix car les adaptations physiologiques au niveau cardiaque, induites par l'entraînement, sont proches de celles observées chez l'homme.

Réduction : Le travail sur tissus prélevés (mitochondries isolées, cardiomyocytes isolés) permettra d'étudier un grand nombre de conditions, limitant ainsi au maximum le sacrifice d'animaux. Pour finir, le nombre d'animaux estimés est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : Les méthodes utilisées sont soit non invasives (protocole d'entraînement), ou finalement sans réveil (anesthésie létale suivit d'un prélèvement d'organe).

Enfin, les rats seront logés dans des cages de 3 individus, avec nourriture ad libitum et accès à de l'eau fraîche. Un enrichissement de l'environnement sera présent et régulièrement renouvelé (tunnels, abris, cube de bois, coton). Un animalier formé contrôlera le bien-être des animaux tous les jours et nettoiera les cages une fois par semaine.

17152 Dans les pays à élevage intensif, des traitements hormonaux sont utilisés pour la maîtrise des cycles sexuels dans les élevages de mammifères domestiques, particulièrement les ovins, porcins, caprins et bovins. Ces traitements sont indispensables pour pratiquer l'insémination artificielle et diminuer les périodes improductives en permettant un étalement de la production de lait et de viande sur toute l'année.

Bien que ces pratiques zootechniques soient largement utilisées depuis de nombreuses années, un certain nombre de problèmes (tel que la réponse immunitaire aux gonadotrophines injectées) restent récurrents et conduisent à de mauvais résultats de fertilité chez les femelles traitées et inséminées. Cela nécessite de devoir répéter les traitements plusieurs fois avant d'obtenir une réponse de l'animal et une gestation, et entraîne une perte économique pour l'éleveur.

Notre société développe une méthode alternative aux traitements d'induction de l'ovulation. Les molécules que nous avons développées ont été sélectionnées grâce à des essais *in vitro*, et celle présentant la meilleure activité *in vivo* a été sélectionnée pour un développement en tant que médicament. A ce stade, le mode de production de la molécule candidat médicament doit être défini et sa formulation validée, en vue d'un développement réglementaire pré-clinique et clinique. Ces versions seront testées *in vivo* chez le rat pour valider leur activité puis sélectionner la plus efficace. Nous estimons également, qu'au cours du développement de la molécule ces 5 prochaines années, il sera nécessaire de confirmer l'activité *in vivo* d'une dizaine de séries de production de la molécule avant et durant les phases précliniques et cliniques. Pour tous ces tests, deux bio-essais de la pharmacopée seront utilisés. L'expérimentation sera réalisée sur des rats de 21 jours.

La règle des 3R est appliquée comme suit :

REMPACEMENT : La fonction de reproduction chez les mammifères est le résultat d'une communication hormonale étroite et complexe entre l'hypothalamus, l'hypophyse, et les gonades. Il n'existe pas de modèle *in vitro* pour étudier une telle complexité. Les propriétés pharmacocinétiques des molécules sont des paramètres qui vont également interférer sur l'effet final et qui ne sont pas mesurables *in vitro*.

REDUCTION : Le nombre total d'animaux a été calculé en fonction du nombre de molécules à tester que nous estimons pouvoir obtenir au cours des 5 prochaines années. Deux types de protocoles seront réalisés : un chez le rat mâle et un chez la femelle. Deux cent trente (230) mâles et deux cent trente (230) femelles seront utilisés au maximum. Le nombre d'animaux par lot a été déterminé grâce à des résultats préliminaires, et des tests statistiques.

RAFFINEMENT : Les conditions d'hébergement des animaux ne seront pas modifiées. Il y aura un enrichissement du milieu par ajout de copeaux et de jouets. En cas d'isolement ou de prostration, l'expérimentation sur cet animal sera immédiatement interrompue et l'animal sera euthanasié.

17153 Le surpoids, l'obésité et le diabète sucré favorisent la survenue des maladies cardiovasculaires mais altèrent aussi la capacité de récupération des patients ayant eu un infarctus du myocarde. Les origines d'un dysfonctionnement cardiaque chez une personne en surpoids et diabétique ne sont pas encore bien comprises. Ces pathologies métaboliques engendrent des états inflammatoires chroniques caractérisés par une invasion de cellules immunitaires notamment au niveau du tissu adipeux. Ce tissu adipeux malade dialogue à distance avec le cœur par la sécrétion de molécules néfastes qui vont contribuer à son dysfonctionnement voire à l'arrêt brutal de ses fonctions.

Nous avons identifié un récepteur appelé GPR50 régulant le dialogue entre le tissu adipeux et le cœur. Nous supposons que l'absence de GPR50 induit un dialogue malsain entre le tissu adipeux et le cœur favorisant ainsi un dysfonctionnement cardiaque dans le contexte d'une alimentation dite « Mac Donalds ».

Dans ce projet, nous analyserons l'effet d'altérations métaboliques sur l'aggravation de la dysfonction cardiaque en réponse à un IM. Ce projet comporte 6 procédures qui impliqueront 2400 souris au total sur une durée de 5 ans.

Les interactions entre les tissus adipeux et le cœur sont des phénomènes complexes que des modèles *in vitro* ne peuvent pas recréer. Seuls ces modèles *in vivo* nous permettront de comprendre le rôle de ce nouveau régulateur dans le remodelage et la réparation consécutifs à une ischémie myocardique dans un contexte diabétique et obésogène.

Pour développer l'obésité, les souris seront nourries avec un régime hyperlipidique, mimant le régime alimentaire riche en graisses chez l'homme. Un infarctus sera induit chez les souris adultes. Nous analyserons ensuite dans ces modèles murins la fonction et le remodelage cardiaque 28 jours après l'IM par échocardiographie et analyses histologiques permettant d'analyser la structure du tissu et la réponse immuno-inflammatoire à différents temps post- IM, ce qui permettra de savoir quels types de cellules inflammatoires sont recrutés au niveau du cœur après l'ischémie. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures invasives se dérouleront sous anesthésie et antalgies avec une surveillance journalière. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'arrêt des procédures voire la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle de GPR50 dans le dialogue tissu adipeux/cœur ainsi que son mode d'action dans le contrôle de l'inflammation associée à l'IM. Ces résultats permettront de développer de nouvelles thérapies et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients souffrant d'un IM et de ces maladies métaboliques.

17154 Au cours des six derniers mois, le coronavirus SARS-CoV-2 a infecté près de 12 millions de personnes et en a tué plus de 540 000 dans le monde. L'infection par le SARS-CoV-2 provoque la maladie COVID-19 qui peut entraîner un syndrome de détresse respiratoire aiguë sévère. Le SARS-CoV-2 infecte les cellules pulmonaires alvéolaires de type II qui expriment des niveaux élevés de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2), utilisée par le virus pour l'entrée dans les cellules hôtes. Des symptômes neurologiques, notamment une confusion et une altération de l'état mental, ont été observés chez des patients atteints de COVID-19 en particulier chez les personnes âgées. L'infection cérébrale est un nouvel aspect de la pathogenèse du coronavirus SARS-CoV-2 et nous étudierons comment l'infection cérébrale par le SARS-CoV-2 pourrait interférer avec la propagation et augmenter la sévérité de maladies neurodégénératives préexistantes telles que la tauopathie. Notons que les lésions associées à l'agrégation de la protéine Tau sont les plus fréquentes au sein des maladies neurodégénératives. Elles sont notamment retrouvées dans la maladie d'Alzheimer, la paralysie supra-nucléaire progressive, certaines démences fronto-temporales et la dégénérescence corticobasale. Notre objectif principal est de déterminer si l'infection du système nerveux central par le SARS-CoV-2 majore les lésions des tauopathies et si cette aggravation est associée à une réplication virale intraneuronale et gliale ou à une réaction inflammatoire. Pour mener à bien notre projet, nous réduirons au minimum les études *in vivo* indispensables à l'analyse de l'infection par SARS-CoV-2 sur la tauopathie au niveau de l'organisme. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 400 souris (160 souris P301ST43xK18hACE2, 160 souris K18hACE2 et 80 souris P301ST43). La règle des 3R a été considérée pour la mise en place

du projet et sera appliquée 1) remplacer : les études de propagation de la pathologie de tau après infection par le SARS-CoV-2 permettant de répondre aux questions posées ne peuvent être réalisées que sur des souris transgéniques ; 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 animaux sont hébergés en groupe avec un nid dans chaque cage. Les animaux sont soumis à une chirurgie sous anesthésie générale. La chirurgie est effectuée en analgésie et ne s'accompagne pas d'effets secondaires dommageables. Les paramètres vitaux des animaux sont contrôlés tout au long de la procédure. Le réveil des animaux est surveillé et une dose d'antalgique est administrée aux animaux afin de réduire la souffrance post-opératoire .

17155 Le surpoids, l'obésité et le diabète sucré favorisent la survenue des maladies cardiovasculaires mais altèrent aussi la capacité de récupération des patients ayant eu un infarctus du myocarde. Les origines d'un dysfonctionnement cardiaque chez une personne en surpoids et diabétique ne sont pas encore bien comprises. Ces pathologies métaboliques engendrent des états inflammatoires chroniques caractérisés par une invasion de cellules immunitaires notamment au niveau du tissu adipeux. Ce tissu adipeux malade dialogue à distance avec le cœur par la sécrétion de molécules néfastes qui vont contribuer à son dysfonctionnement voire à l'arrêt brutal de ses fonctions.

Nous avons identifié un récepteur appelé GPR50 régulant le dialogue entre le tissu adipeux et le cœur. Nous supposons que l'absence de GPR50 induit un dialogue malsain entre le tissu adipeux et le cœur favorisant ainsi un dysfonctionnement cardiaque dans le contexte d'une alimentation dite « Mac Donalds ».

Dans ce projet, nous analyserons l'effet d'altérations métaboliques sur l'aggravation de la dysfonction cardiaque en réponse à un IM. Ce projet comporte 6 procédures qui impliqueront 2400 souris au total sur une durée de 5 ans.

Les interactions entre les tissus adipeux et le cœur sont des phénomènes complexes que des modèles *in vitro* ne peuvent pas recréer. Seuls ces modèles *in vivo* nous permettront de comprendre le rôle de ce nouveau régulateur dans le remodelage et la réparation consécutifs à une ischémie myocardique dans un contexte diabétique et obésogène.

Pour développer l'obésité, les souris seront nourries avec un régime hyperlipidique, mimant le régime alimentaire riche en graisses chez l'homme, Un infarctus sera induit chez les souris adultes. Nous analyserons ensuite dans ces modèles murins la fonction et le remodelage cardiaque 28 jours après l'IM par échocardiographie et analyses histologiques permettant d'analyser la structure du tissu et la réponse immuno-inflammatoire à différents temps post- IM, ce qui permettra de savoir quels types de cellules inflammatoires sont recrutés au niveau du cœur après l'ischémie.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant une analyse statistique efficace des résultats d'après nos données antérieures. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures invasives se dérouleront sous anesthésie et analgésiques avec une surveillance journalière. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'arrêt des procédures voire la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le rôle de GPR50 dans le dialogue tissu adipeux/cœur ainsi que son mode d'action dans le contrôle de l'inflammation associée à l'IM. Ces résultats permettront de développer de nouvelles thérapies et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients souffrant d'un IM et de ces maladies métaboliques.

17156 Les lymphomes sont des tumeurs malignes qui se développent à partir des lymphocytes (B le plus souvent) c'est-à-dire des cellules sanguines qui constituent un sous-groupe de globules blancs. Les lymphomes cérébraux primitifs (LCP) sont des lymphomes présents dans le système nerveux central (cerveau, œil, liquide céphalorachidien et moelle épinière) sans atteinte des autres organes. Chez les patients immunocompétents, les analyses histologiques montrent presque toujours un lymphome diffus à grandes cellules B.

C'est une maladie rare (environ 300 nouveaux cas par an en France) peu connue et de mauvais pronostic avec les traitements actuels. En effet, le traitement des LCP est difficile en raison de

l'agressivité des cellules B malignes, de la barrière hémato-encéphalique qui limite la biodisponibilité de nombreux médicaments dans le parenchyme cérébral et de la toxicité neurologique de certains traitements.

Actuellement, les traitements disponibles des LCP reposent sur une chimiothérapie à forte dose. Cependant, la moitié des patients traités rechutent dans des délais variables.

De plus, la réponse immunologique est réduite dans le cerveau, ce qui pourrait favoriser la prolifération dans le cerveau des cellules lymphomateuses et limiter l'efficacité des immunothérapies.

Il est donc nécessaire de mieux caractériser les mécanismes biologiques qui sous-tendent le microenvironnement immunosuppresseur des LCP et leur implication dans le maintien et la prolifération de ces tumeurs.

Les LCP secrètent des facteurs immunosuppresseurs et des facteurs qui entretiennent la prolifération des cellules malignes. Ainsi, bien qu'une réponse immune anti-tumorale puisse être induite dans le cerveau, nous faisons l'hypothèse que les facteurs sus-cités représentent de possibles mécanismes de résistance aux immunothérapies. Ces deux facteurs pourraient alors représenter des cibles thérapeutiques à associer à une immunothérapie pour en augmenter l'efficacité.

Ce projet a pour objectif de:

1. Caractériser le rôle du facteur immunosuppresseur et du facteur proliférant dans la pathogénèse des LCP,
2. Déterminer les interactions de ces deux facteurs
3. Tester différentes combinaisons d'immuno-modulateurs dans des modèles murins de LCP.

Remplacement : Pour ce projet, nous utiliserons des cultures cellulaires et des expérimentations sur des modèles murins de LCP. Les modèles seront générés par inoculation intracérébrale de lignées cellulaires de lymphomes humains. Nous testerons *in vivo* l'efficacité de combinaisons thérapeutiques associant une immunothérapie avec des composés anti-IL10 et/ou anti-BAFF ainsi qu'avec des traitements anti-lymphomes disponibles et ayant potentiellement la capacité de stimuler le microenvironnement immunitaire cérébral.

L'objectif de cette étude est de fournir un rationnel pour de futurs essais cliniques avec de nouvelles combinaisons de médicaments, afin d'améliorer le pronostic de cette maladie.

Réduction : Ce projet nécessitera l'utilisation de 624 souris. Ce nombre a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Raffinement : 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. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux seront optimisées pour limiter leur stress. De plus, ils seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations seront arrêtées avant la souffrance des animaux.

17157 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 tester différents peptides spécifiques du SARS-Cov-2 capables d'activer une réponse humorale et ou cellulaire et analyser les effets engendrés par cette activation, c'est à dire si l'immunisation induit des anticorps neutralisants ou facilitants et ou une réponse cellulaire spécifique 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 différentes souches de souris ; la Balb/c et la souris Swiss (SW), ainsi que la C57BL/6 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 1520 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.

Cette nouvelle version de la saisine est un amendement afin d'ajouter des souches de souris permettant de déterminer si les peptides immunogènes induisent une réponse immunitaire satisfaisante dans différentes souches de souris présentant différents HLA.

Cette nouvelle version est en complément des tests réalisés sur les souris SWISS et BALB/c, nous souhaitons ajouter 180 souris, en sachant qu'il n'a été utilisé pour le moment que 100 souris. En effet, après utilisations des souris SWISS et BALB/C, nos premiers tests n'ont pas donné satisfaction. Nous souhaiterions continuer nos tests afin de déterminer si une meilleure immunisation des souris C57BL/6 pourrait être possible. Pour cela nous souhaitons testés nos immunisations sur la C57BL6F1-Tg (HLA-A*0201/H2-Kb) A*0201, la C57BL6F1-Tg (HLA-A11), la C57BL6F1-Tg (HLA-B7), la C57BL6F1-Tg (HLA-A1), la C57BL6F1-Tg (HLA-A44), la C57BL6F1-Tg (HLA-B24), la C57BL/6N et la C57BL/6jRJ.

Nous souhaiterions utiliser 60 souris C57BL/6 (N et jRJ) et 120 souris pour le reste des souris C57BL/6 HLA (n = 20 par groupe).

Nous souhaiterions reproduire la même procédure décrite dans la saisine avec quelques modifications présentées ci-après.

17158 Durée du projet (années): 3 ans

Mot clés : syndrome de détresse respiratoire aigu, lésions pulmonaires induites par la ventilation mécanique^[SEP]

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une affection critique des poumons responsable d'une chute du taux sanguin d'oxygène (hypoxémie). Les causes de SDRA sont le plus souvent infectieuses (dont le COVID-19). Ce syndrome, relativement fréquent, a une mortalité élevée (entre 30 et 50%). Le traitement du SDRA repose sur l'utilisation d'un respirateur artificiel, afin d'assurer une oxygénation sanguine suffisante. Toutefois, des réglages inadaptés du respirateur peuvent entraîner une surdistension mécanique des alvéoles pulmonaires à chaque insufflation, autrement appelée hyperinflation cyclique. Lorsque celle-ci est présente, elle génère une inflammation pulmonaire et est associée à une surmortalité au cours du SDRA.

Nous faisons l'hypothèse qu'une réduction de l'hyperinflation intracycle pourrait s'accompagner d'une amélioration de la survie des patients, en diminuant l'inflammation dont elle est responsable. Une baisse significative de l'hyperinflation intracycle peut être obtenue par une diminution du volume d'air insufflé par le respirateur à chaque respiration (ventilation ultra-protectrice). Des niveaux de volumes insufflés encore plus faibles (ventilation quasi-apnéique) peuvent être obtenus à l'aide de techniques d'oxygénation extracorporelles remplaçant le poumon (ECMO [extra-corporeal membrane oxygenation]).

Le scanner X pulmonaire offre la possibilité de mesurer l'hyperinflation cyclique à différents réglages du respirateur. La tomographie par émissions de positrons (TEP, une technique d'imagerie nucléaire) permet de mesurer l'intensité de l'inflammation pulmonaire. En les couplant, nous pouvons donc d'évaluer le lien entre l'hyperinflation cyclique (agression mécanique), et l'inflammation pulmonaire (agression biologique) induit par la ventilation mécanique. Ces 2 techniques d'imagerie médicale nous donnent donc l'opportunité d'observer les effets et le lien entre ces 2 types d'agressions lors de l'application de différentes stratégies de ventilation (standard, ultra-protectrice ou quasi-apnéique).

L'objectif de notre projet de recherche translationnelle d'une durée de 3 ans est de montrer qu'une réduction de l'hyperinflation intracycle par la baisse du volume insufflé par le respirateur selon 2 stratégies (ultra-protectrice et quasi-apnéique) est responsable d'une diminution de la réponse inflammatoire pulmonaire au cours du SDRA expérimentale, évaluée de façon non-invasive en imagerie couplée TEP-scanner.

Il est prévu d'utiliser 25 porcs au maximum compte-tenu d'un nombre de décès prématuré (lors de la genèse du SDRA expérimental) attendu de 40% dans ce type d'expérience. Ce nombre est aussi augmenté de 10% dans l'éventualité de problèmes techniques inhérents à la multiplicité des techniques utilisées dans le protocole (réanimation lourde, ECMO, scanner X, radio-chimie).

Procédure - Effets néfastes attendus

Les animaux subiront une unique procédure sans réveil. Ils seront placés sous anesthésie générale profonde, comprenant entre autre une analgésie par opioïdes puissants, comparable à celle utilisé chez l'homme pour les chirurgies lourdes, maintenue durant toute la durée du protocole. Les effets néfastes du SDRA expérimental sont une hypoxémie profonde, comparable à celle observée chez les patients de réanimation avec SDRA. Le ressenti de l'hypoxémie est nul sous ces régimes de sédations. A la fin du protocole, ils seront euthanasiés par surdosage des drogues anesthésiques.

Application des 3 Rs

1. Remplacement : Un modèle animal doit être utilisé car il n'est pas possible de valider la technique chez l'homme car le nombre de scanner requis est responsable d'une irradiation qui serait inacceptable pour les patients. De plus, il est très difficilement envisageable de déplacer un patient de réanimation dans d'une caméra TEP sans le mettre en danger, en particulier si celui-est sous ECMO. Il n'existe pas à ce jour d'alternative non humaine, non animale pour simuler un SDRA.^[SEP]

2. Réduction : A l'aide de données précédemment obtenues, nous avons réalisé un calcul de puissance afin de déterminer le nombre minimal d'animaux nécessaires à la recherche. La réalisation de mesures répétées chez un même animal permet de diviser par 2 le nombre d'animaux requis.

3. Raffinement : Le choix du porc comme modèle expérimental repose sur le fait qu'il s'agit d'une espèce à la fois anatomiquement et physiologiquement proche sur le plan respiratoire des primates et de l'Homme. De plus, la morphométrie (volume pulmonaire) de l'animal permet l'utilisation de la même technique de ventilation (respirateur artificiel) et d'imagerie (scanner X et TEP) que chez l'homme. Le SDRA expérimental est réalisé par inhalation d'acide chlorhydrique alors que l'animal est comateux et puissamment analgésié et ce jusqu'à la fin du protocole. Le protocole d'anesthésie et les doses utilisées font que l'animal ne ressentira aucune douleur. Il doit être euthanasié en fin d'expérience par surdosage des drogues anesthésiques car l'atteinte respiratoire est incompatible avec la survie sans ventilation mécanique.

17159 Les hépatocytes (qui représentent 70% des cellules du foie) cultivés *in vitro* sont un puissant outil permettant d'étudier le métabolisme du foie. Malheureusement, le geste technique permettant leur préparation mais également leur maintien en culture ont été montrés comme étant très difficiles. En effet, des conditions de culture ordinaires ou mal contrôlées conduisent à la transformation (dédifférenciation) des hépatocytes produisant un rapide changement de leur morphologie et une réduction significative de leurs fonctions biologiques spécifiques. Le but de cet enseignement pratique de physiologie animale est de présenter aux étudiants cette notion de dédifférenciation des hépatocytes et d'étudier avec eux des conditions de culture cellulaire permettant de la limiter.

Le projet vise donc à décrire une procédure expérimentale (perfusion du foie d'un rat permettant la préparation des hépatocytes) réalisée lors de travaux pratiques (TP) dispensés à des étudiants de niveau Bac+3 pour l'obtention d'une Licence mention Biologie. En amont de la réalisation du TP, les étudiants auront, durant 2h de travaux dirigés, un enseignement leur présentant non seulement les objectifs pédagogiques et scientifiques de la séance de TP mais également une forte sensibilisation au bien-être animal, au respect de la règle des 3R et à la réglementation en vigueur relative à l'expérimentation animale. En effet, seront détaillées les différentes étapes pratiques mises en place pour la réduction au maximum de la douleur lors de la perfusion du foie de l'animal avec une anesthésie profonde ainsi qu'une analgésie pour la réalisation de cette perfusion (Raffinement). Enfin, il nous faut obligatoirement avoir recours à l'animal pour réaliser une primo-culture hépatocytaire du fait que les lignées cellulaires établies d'hépatocytes ne se dédifférencient pas (Remplacement). Dans le but de respecter la règle des 3R, la perfusion du foie de l'animal sera réalisée par l'enseignant maîtrisant parfaitement le geste technique sous anesthésie profonde (Raffinement), et un seul rat sera suffisant par séance de TP constituée d'un groupe d'une douzaine d'étudiants du fait qu'un foie de rat permet d'obtenir des millions de cellules sur lesquelles de nombreuses conditions de culture peuvent être réalisées (Réduction)

Au total, sur la période de 5 ans, un maximum de 40 rats mâles (réformés WISTAR) sera nécessaire à la formation de 450 étudiants environ. Ce nombre sera ajusté chaque année sur la base des effectifs des promotions.

17160 Au cours des six derniers mois, le coronavirus SARS-CoV-2 a infecté près de 12 millions de personnes et en a tué plus de 540 000 dans le monde. L'infection par le SARS-CoV-2 provoque la maladie COVID-19 qui peut entraîner un syndrome de détresse respiratoire aiguë sévère. Le SARS-CoV-2 infecte les cellules pulmonaires alvéolaires de type II qui expriment des niveaux élevés de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2), utilisée par le virus pour l'entrée dans les cellules hôtes. Des symptômes neurologiques, notamment une confusion et une altération de l'état mental, ont été observés chez des patients atteints de COVID-19 en particulier chez les personnes âgées. L'infection cérébrale est un nouvel aspect de la pathogenèse du coronavirus SARS-CoV-2. Nos objectifs sont : 1) de déterminer les voies de la neuroinvasion lors d'une infection par le virus SARS-CoV-2, 2) de caractériser les atteintes à l'intégrité et à la topologie des systèmes vasculaires lymphatique et sanguin du SNC, 3) de caractériser l'infiltration intracérébrale de cellules immunitaires associée à la neuro-invasion. Pour mener à bien notre projet, nous réduirons au minimum les études *in vivo* indispensables à l'analyse de

l'infection par le SARS-CoV-2 au niveau de l'organisme. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 80 souris transgéniques. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée 1) remplacer, les études de propagation du virus SARS-CoV-2 permettant de répondre aux questions physiopathologiques que nous posons ne peuvent être réalisées que sur des organismes complexes susceptibles à l'infection ; 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 animaux sont hébergés en groupe avec un nid dans chaque cage. Les paramètres vitaux des animaux sont contrôlés tout au long de la procédure expérimentale.

17161 La prévalence des bactéries multi résistantes, en particulier les entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) augmente depuis 15 ans affectant jusqu'à 10% des patients en réanimation. Leur résistance aux antibiotiques est responsable d'une augmentation de la mortalité des patients présentant ces infections. Ces infections nécessitent une transmission digestive de cette EBLSE dans un contexte de situation favorable à leur implantation durable au sein du microbiote digestif. Le principal facteur de risque de colonisation digestive durable par une EBLSE est l'exposition récente à un antibiotique avec un risque proportionnel à l'impact de cet antibiotique sur le reste de la flore bactérienne digestive.

Dans ce contexte, identifier les antibiotiques dont l'exposition est associée à un faible risque d'émergence d'EBLSE au sein du microbiote digestif est nécessaire. Ainsi, ces antibiotiques, à efficacité équivalente, seront favorisés lors du traitement des patients. L'étude de l'association entre EBLSE et exposition aux antibiotiques chez les patients est cependant complexifiée par des expositions aux antibiotiques non standardisées (molécules multiples, doses variables, absence d'étude d'EBLSE possible chez le volontaire sain). C'est dans ce contexte que notre projet s'inscrit. Précisément, il vise à étudier les variations de quantités d'EBLSE digestives chez des souris SWISS préalablement colonisées à la suite d'expositions à différents antibiotiques.

Notre modèle de colonisation digestive par des bactéries multi ou hautement résistantes aux antibiotiques chez des souris SWISS femelles permet de se rapprocher de la colonisation digestive humaine par ces bactéries. Le modèle animal permet une exposition standardisée à des modalités multiples d'antibiotiques qu'il n'est pas possible d'atteindre chez l'humain (expositions successives à des antibiothérapies différentes notamment). Coloniser des volontaires sains par des bactéries multi résistantes ne serait par ailleurs pas éthique.

Un nombre total de 375 souris sur 5 ans sera nécessaire à ce projet. Cette étude a été rédigée et pensée de manière à respecter la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement). Afin de justifier de la validité et la reproductibilité des résultats obtenus, et pour les analyses statistiques ultérieures, un minimum de 15 souris par lot est nécessaire. Le bien-être animal a été l'une des priorités dans la conception de cette étude mais nous ne pouvons à ce stade nous passer d'utiliser des animaux, c'est pourquoi nous n'utiliserons que le nombre d'animaux nécessaires pour mener à bien cette étude et tous les résultats obtenus seront utilisés et exploités.

Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'elles pourraient éprouver. Un suivi régulier sera effectué sur l'ensemble des animaux et des indicateurs comportementaux et physiques sont prédéfinis et constituent les points limites. Les antibiotiques seront administrés par gavage (l'administration dans l'eau de boisson ne peut pas être envisagée pour l'ensemble des molécules testées compte tenu de stabilités variables, une administration uniforme sous forme de gavage a donc été décidée). 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. Ce projet ne débutera que lorsque l'APAFIS ci présent aura été validé par le comité d'éthique et le ministère.

17162 Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase primaire, processus physiologique permettant l'arrêt des saignements. Elles sont de petite taille (2 μ m de diamètre environ) et circulent sous forme discoïde. Cette morphologie est soutenue par un anneau de microtubules (MT) que l'on appelle bande marginale. Certaines pathologies s'accompagnant d'une perte de la forme

discoïde sont liées à des anomalies de certains types de tubuline, les constituants des microtubules. Notre projet vise à étudier le rôle de certaines tubulines dans le mécanisme unique d'assemblage des MT dans la bande marginale des plaquettes et à terme d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients présentant des maladies plaquettaires.

Le rôle de la tubuline beta5 est connu au niveau du Système Nerveux Central (SNC) mais pas dans la lignée plaquettaire où elle est également exprimée. Nous nous proposons d'étudier plus finement son rôle dans les plaquettes de souris déficientes pour le gène de la tubuline beta5 spécifiquement dans la lignée mégacaryoblastique. Les expériences consisteront d'une part en des prélèvements de sang pour réaliser des numérations plaquettaires, l'évaluation *ex vivo* de la biologie et de la morphologie des plaquettes et de leur réactivité, et la mesure du temps de saignement suite à une coupure au niveau de l'extrémité de la queue de l'animal. Nous serons attentifs à être en adéquation avec la règle des 3R.

Réduction. Une même souris sera utilisée pour plusieurs types d'expérience et comme nous maîtrisons l'ensemble des techniques mises en œuvre dans ce projet, aucune mise au point préalable n'est nécessaire. Le nombre d'animaux utilisés pour cette étude est calculé au plus près afin de permettre une analyse statistique des données (test de Student).

Remplacer. Les plaquettes sont formées à partir d'extensions anucléées de grosses cellules (les mégacaryocytes) principalement situées dans la moelle osseuse. Libérées dans la circulation sanguine les plaquettes se chargent en protéines plasmatiques pour devenir fonctionnelles. L'absence de noyau empêche la culture de ces fragments cellulaires *in vitro*. De plus les événements de maturation qui se déroulent dans la circulation sanguine une fois les plaquettes libérées nous imposent de les extraire à partir du sang d'un animal. C'est pour cela que l'utilisation de souris est incontournable.

Raffinement. Une attention particulière est portée au bien-être des animaux. Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés et un traitement approprié contre la douleur leur est administré. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton compressé 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.

L'étude se fera sur 64 souris.

[AVENANT] Pour compléter l'évaluation *ex vivo* de la biologie et de la morphologie des plaquettes et de leur réactivité, l'étude nécessitera 288 souris supplémentaires, soit 352 souris au total (64 + 288 souris supplémentaires). Les bénéfices apportés par l'étude seront une meilleure compréhension du rôle des tubulines dans les fonctions plaquettaires. Plus spécifiquement, les résultats trouveront une application directe dans le domaine médical. En effet, les gènes des tubulines ici étudiées pourraient, à terme, être ajoutées dans la liste de gènes habituellement séquencés lors de travaux à visée exploratoires dans des cas de maladies congénitales plaquettaires non diagnostiquées.

17163 Du fait de notre alimentation (poissons, crustacée, boisson...) et de notre environnement (océan, rivière, air, sol...), nous sommes exposés à différents types de plastique, notamment sous la forme de microplastique (MPLs). Leur toxicité sur la sphère digestive et particulièrement sur la fonction barrière de l'intestin n'a pas été encore complètement évaluée bien qu'ils aient été retrouvés récemment dans les fèces de volontaires sains. Les connaissances sur les interrelations entre ingestion de microplastiques et modulation de la fonction barrière de l'intestin sont parcellaires, l'essentiel des travaux décrits à ce jour portant sur les organismes marins et le poisson zèbre comme modèle d'étude. Les seules études relatives aux mammifères ont très récemment été décrites chez la souris. Elles ont, par ailleurs, été réalisées avec des MPLs de polystyrène, partiellement représentatives des formes plastiques retrouvées dans l'environnement et l'alimentation. Les résultats de ces études confortent toutefois l'hypothèse d'une altération des fonctions gastro-intestinales, avec une diminution de la sécrétion de mucus et l'établissement d'une modification du microbiote intestinal. Les MPLs peuvent aussi adsorber, du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques, une large variété de contaminants chimiques (tels que les phtalates, le bisphénol A, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les polychlorobiphényles (PCBs) et les antibiotiques.

Deux contaminants retrouvés de façon ubiquitaire dans l'environnement, un antibiotique, le sulfaméthoxalone et un composé perfluoré, l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) choisis aussi pour leur

effet sur le microbiote et le foie respectivement seront évalués, adsorbés sur les MPLs. Parmi tous les plastiques, nous avons choisi de mesurer l'impact de l'ingestion de polyéthylène (PE), le constituant majeur des MPLs retrouvés dans l'environnement, en ciblant deux classes de taille représentatives de MPLs, 1-10 μm et 10-45 μm , et 3 doses d'expositions compatibles avec l'exposition réelle humaine.

Par ailleurs, pour mimer l'exposition au plastique dans un contexte d'une alimentation « occidentale », le projet évaluera aussi les conséquences de l'exposition aux MPLs de PE en utilisant des régimes alimentaires « High fat Diet » (HFD), riche en graisse, et « Western Diet » (WD), riche en sucre et en graisse, ceux-ci pouvant aussi modifier les effets de l'ingestion de plastiques sur la sphère digestive.

L'impact sur la fonction barrière de l'intestin sera appréhendée en étudiant les acteurs de la barrière intestinale (épithélium/mucus/microbiote), aux interrelations largement méconnues et ce, d'autant plus sous perturbation nutritionnelle. Les conséquences sur l'axe intestin/foie seront également évaluées du fait de l'utilisation de régimes HFD et WD. Dans ce contexte, seule une approche faisant appel à un modèle animal nous permettra d'explorer la complexité des interactions entre les MPLs de PE avec les différents acteurs de la barrière intestinale fragilisée ou non par une alimentation HFD/WD, et des conséquences/interrelations avec la fonction hépatique.

Pour obtenir des résultats avec une puissance statistique suffisante, ce projet de 3 ans nécessite 984 souris mâles C57BL/6 hébergées collectivement avec enrichissement (maisonnette et bâtonnets de bois) dans des conditions optimales (contrôle des températures et du cycle jour/nuit), avec suivi quotidien de leur bien-être et prise en charge en cas d'inconfort, en sortant les animaux éventuellement affectés de la procédure et en administrant des analgésiques si nécessaires.

17164 Le cancer chez les enfants et les adolescents est un évènement 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.

L'ostéosarcome fait partie de ces cancers et est la 1^{ère} cause de tumeurs malignes primitives de l'os, et touche principalement des adolescents et jeunes adultes. Après les progrès majeurs apportés par la chimiothérapie dans les années 70-80, la survie depuis les années 90 n'a été que peu améliorée et reste autour de 60-70% à 5 ans. La présence de métastases et la mauvaise réponse aux traitements standards par chimiothérapie s'est révélée être les facteurs pronostiques majeurs de risque de récurrence. Dans l'ostéosarcome, les récurrences sont habituellement métastatiques et le plus souvent localisées au niveau pulmonaire. Le traitement actuel de l'ostéosarcome est une combinaison de chirurgie et de chimiothérapie, mais le pronostic reste faible en raison de la résistance au traitement et des métastases précoces. L'ensemble de ces données soulignent l'importance de comprendre les principes moléculaires permettant à ce type de tumeurs de contourner l'effet anti-tumoral des chimiothérapies et aboutir à ces récurrences métastatiques et à la résistance au traitement.

Nous avons identifié récemment dans notre laboratoire des marqueurs de mauvais pronostic pour l'ostéosarcome et des voies régulées par celui-ci. L'activation d'une voie spécifique a été observée uniquement dans des patients aux mauvais pronostics (groupe associé à une survie diminuée, ou présentant plusieurs caractéristiques en faveur d'une agressivité tumorale). Notre objectif est d'explorer cette voie comme cible thérapeutique dans l'ostéosarcome.

Nous utiliserons les modèles *in vivo* implantés chez la souris, développés dans notre laboratoire dans le cadre des 2 projets, et dérivés des tumeurs de patients en rechute/progression (exemple : résistants aux différentes chimiothérapies, croissance rapide...) et au diagnostic, appelé Patient Derived Xenograft (PDX). Compte tenu de la rareté du matériel tumoral, le développement de modèles de xénogreffes à partir de tumeurs issues de patients (PDX) est essentiel pour pouvoir proposer les modèles expérimentaux les plus adaptés.

Nous évaluerons la sensibilité *in vivo* sur des PDX d'ostéosarcome en rechute et au diagnostic à des molécules modulant cette voie soit par des antagonistes, soit par des agonistes. Nous étudierons les mécanismes d'action de ces molécules et évaluerons leur application thérapeutique à un groupe d'ostéosarcome de plus mauvais pronostic, dès la prise en charge initiale. Dans ce projet, nous envisageons de greffer 10 PDX (modèle dérivé du patient). Chaque modèle sera traité avec des molécules antagonistes et agonistes pour étudier les facteurs modifiés par la modulation de cette voie

cible activée chez les patients de mauvais pronostic. Nous souhaitons démontrer que cette voie peut être utilisée à la fois comme marqueur de diagnostic et comme cible thérapeutique. Il est actuellement impossible de remplacer les modèles expérimentaux *in vivo* par des méthodes alternatives car elles ne traduisent pas fidèlement le développement de la maladie et particulièrement l'environnement nécessaire à ce type de tumeur. D'autre part, la réponse au traitement implique souvent différents systèmes au sein de l'organisme qui ne peuvent pas être reproduits *in vitro*. Nos données ainsi que plusieurs études décrivent nos PDX comme des modèles qui conservent presque toutes les caractéristiques des tumeurs chez le patient (génomique, stroma, résistance à chimio...).

Lors d'une précédente étude, nous avons constaté que la rapidité et le taux de prise variaient d'un modèle à l'autre, selon qu'il était implanté en sous-cutané ou en paratibial. Donc, afin de choisir le lieu d'implantation (paratibial ou sous-cutané) le plus pertinent pour les études d'efficacité, nous grefferons chaque PDX sur 5 souris dont 3 entre le tibia et le muscle (paratibial) et 2 sur chaque flanc (sous-cutané) (5 souris x 10 PDX = 50 souris). D'après notre expérience passée, afin d'obtenir un panel de modèles reflétant la variabilité des ostéosarcomes, nous grefferons 10 PDX établis précédemment (représentant différent type histologique d'ostéosarcomes en rechute ou au diagnostic). Une fois le lieu d'implantation choisi, chaque PDX sera amplifié sur 10 souris (10 souris x 10 PDX = 100 souris). L'étude fonctionnelle/thérapeutique nécessite 1200 souris (30 souris par groupe x 4 groupes x 10 modèles PDX = 1200 souris), ce qui prend en compte le taux de prise et les différents groupes d'animaux. Nos résultats *in vitro* nous permettront de définir les groupes de traitement les plus pertinents afin de réduire le nombre d'animaux. Tous les moyens seront mis en œuvre pour améliorer le bien-être des animaux pendant l'étude. Toutes les injections seront réalisées après application d'un anesthésique local, les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale et les animaux recevront un analgésique post-opératoire et tout au long du développement de la maladie si nécessaire. Les souris seront hébergées en groupe et l'environnement sera enrichi avec un enrichissement adapté. Ce projet utilisera 1350 animaux.

17165 Les virus oncolytiques sont de nouveaux agents thérapeutiques anti-tumoraux qui présentent trois caractéristiques majeures : 1) La capacité à cibler et détruire spécifiquement les cellules tumorales sans toucher aux cellules saines, 2) Une forte immunogénicité qui permet d'activer très efficacement les cellules de l'immunité anti-tumorale, 3) La possibilité d'exprimer au sein même des tumeurs des molécules thérapeutiques d'intérêt qui seront produites par les cellules tumorales infectées.

Notre équipe travaille depuis de nombreuses années sur l'utilisation de ces virus, ce qui nous a permis de caractériser leurs effets thérapeutiques contre différents types de tumeurs agressives (mésothéliome, mélanome, cancer du poumon...). Notre objectif scientifique principal est de caractériser et d'exploiter les réponses immunitaires induites par ces virus, ce qui nécessite de travailler dans des organismes vivants puisque ces réponses impliquent des mécanismes et des types cellulaires qui fonctionnent de façon systémique. En parallèle, nous travaillons à caractériser les mécanismes de résistance à ces virus, qui impliquent notamment la réponse antivirale interféron (IFN) de type I, et à identifier des agents pouvant être utilisés en combinaison avec ces virus.

Le virus oncolytique que nous utilisons est le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) qui peut infecter les cellules tumorales dérivées de quasiment toutes les espèces de mammifères.

La problématique principale de ce projet est que la réponse antivirale innée a différentes fonctions antagonistes dans le cadre de la virothérapie anti-tumorale. Afin de favoriser la réplication du virus dans les cellules tumorales, il est donc nécessaire de l'inhiber. En revanche, cette réponse antivirale est aussi utile pour activer la réponse immunitaire anti-tumorale et pour protéger les cellules saines de l'infection virale. Dans le cadre d'une collaboration, nous avons développé un anticorps bispécifique qui inhibe la réponse IFN de type I uniquement dans les cellules tumorales, ce qui permet de maintenir l'infection oncolytique tout en conservant les bénéfices de la réponse antivirale sur les autres cellules.

Les expérimentations animales décrites ci-dessous visent à étudier l'efficacité de cet inhibiteur spécifique dans le cadre d'une utilisation du VSV comme agent oncolytique.

Une attention toute particulière sera donnée à la réduction du nombre de souris utilisées par des études statistiques a priori.

Les méthodologies utilisées prendront en compte le suivi des points limites pour interrompre l'expérimentation le plus tôt possible et minimiser douleur et détresse des animaux. De, plus, des technologies alternatives sont utilisées dans notre laboratoire pour limiter l'utilisation d'animaux, notamment des cultures *in vitro* en 3 dimensions (sphéroïdes) et des puces microfluidiques qui nous permettent de reproduire certain aspect du microenvironnement tumoral et de nous affranchir de certaines expérimentations *in vivo*.

Le milieu d'hébergement des souris sera par ailleurs enrichi (lambeaux de papier, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.

La réalisation du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 280 souris sur 3 ans.

17166 Les génisses laitières élevées pour le renouvellement du troupeau sont ultra majoritairement séparées de leur mère à la naissance pour être élevés en allaitement artificiel. Les mères sont traitées sans nourrir leur veau. Cette pratique est de plus en plus questionnée d'un point de vue bien-être animal et travail pour l'éleveur, que ce soit par certains éleveurs eux-mêmes ou par nombre de consommateurs/citoyens. Pour différentes raisons, certains éleveurs ont commencé à faire de l'élevage de veaux femelles par des vaches nourrices au pâturage. L'utilisation d'une telle pratique soulève des questionnements notamment en termes de bien-être et de santé des animaux dans quatre phases-clés : l'adoption, la surveillance et la gestion d'un groupe nourrices-veaux au pré, puis lors du sevrage des veaux et enfin la façon d'appivoiser les génisses. Il est rapporté empiriquement par les éleveurs que les génisses élevées sous nourrices peuvent être plus difficiles à manipuler, plus stressées dans des situations nouvelles, comme la salle de traite, que des veaux élevés classiquement en allaitement artificiel. Mais aucune étude scientifique n'existe à notre connaissance pour observer et comprendre le comportement des animaux dans un tel système. L'objectif de ce projet est donc de réaliser un essai méthodologique ayant pour but de (1) tester la faisabilité d'observer et tester le comportement/bien-être/santé des vaches nourrices et de la génisse de renouvellement avant et après sevrage et de les suivre jusqu'à l'arrivée en salle de traite ; et (2) tester un protocole d'appivoisement compatible avec les pratiques d'élevage qui sera réalisé soit dans des deux semaines qui suivent le sevrage, soit 4-6 semaines plus tard (hors sevrage). Ceci est donc un projet de recherche fondamental et appliqué dans le but de développer et standardiser des tests comportementaux et un protocole d'appivoisement pour les utiliser dans des projets ultérieurs. En réalisant une étude méthodologique, on concourt ainsi au raffinement des méthodes expérimentales en adaptant les tests, mais également à la réduction des effectifs en déterminant le nombre d'individus nécessaire pour répondre aux objectifs du test. Par la nature même de notre approche, qui est comportementale, l'utilisation de l'animal dans son intégralité est nécessaire pour répondre à nos objectifs scientifiques. Un suivi de l'état de santé des animaux sera également réalisé, avec une attention particulière portée aux pathologies liées aux parasites internes.

Ce projet méthodologique durera 26 mois et impliquera 7 vaches nourrices et 14 génisses de renouvellement. Le protocole d'appivoisement consiste à isoler très brièvement l'animal (<10min) et de petit à petit à l'inciter à venir manger dans la main de l'Homme à travers un certain nombre de paliers progressifs. Cela nécessite donc plusieurs jours de réalisation, jusqu'à 15 jours maximum. Ce protocole sera appliqué dès le sevrage pour le premier lot de génisses (N=7) et 4 à 6 semaines après sevrage pour le second lot (N=7), le but étant de déterminer quelle période serait la plus propice pour des effets à long terme. Afin d'en vérifier les effets, 2 tests comportementaux, utilisés classiquement dans l'étude de la relation Homme-Animal seront réalisés avec les génisses : le test d'approche, réalisé 5 fois au cours des 26 mois (ainsi qu'une fois sur les vaches nourrices), et le test de docilité réalisé 4 fois au cours des 26 mois. Ils consistent à approcher l'animal et déterminer à partir de quelle distance celui-ci va effectuer un mouvement de retrait. Ensuite, pour tester la docilité, la personne va tenter d'immobiliser l'animal dans un coin et essayer de le toucher. Ces tests sont individuels mais d'une durée très courte (<10min) et s'arrête dès que l'animal présente un comportement dangereux pour lui ou l'homme. Parallèlement, des observations seront réalisées pour évaluer l'état de santé des animaux et des prélèvements de sang et de fèces seront effectués à 4 moments distincts de la vie des génisses, afin d'évaluer les risques d'infestation par des parasites.

La règle des 3R est respectée 1) aucune alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est possible (remplacer) 2) le nombre d'animaux est réduit à l'effectif minimum permettant de mettre en évidence

des différences significatives entre les lots par des tests statistiques adaptés 3) un ensemble de mesures veille au raffinement de l'expérimentation. En effet, le projet est mené par du personnel compétent et l'ensemble des animaux sera élevé selon leur mode d'élevage habituel au pâturage avant sevrage puis en bâtiment durant l'hiver, puis à nouveau au pâturage. Le pâturage se fait dans des prairies qui disposent d'espaces ombragés pour le confort des animaux durant les périodes de forte chaleur. Les tests d'approche et de docilité qui seront réalisés en bâtiment, se feront dans une arène à laquelle les animaux auront été habitués pour limiter leur angoisse. Les veaux y seront menés via un personnel compétent et formé. La surveillance des animaux sera journalière et elle aussi réalisée par un personnel compétent. La présence de signes cliniques sera prise en compte dans la décision de l'application des critères d'arrêt mis en place pour l'expérimentation. Il en va de même lors des tests : une surveillance minutieuse des animaux sera réalisée et permettra l'arrêt à tout instant du test si la situation le nécessite. En cas de blessure potentielle lors d'un test, ce dernier sera immédiatement arrêté et l'animal recevra sans attendre les premiers soins. Suivant la gravité établie de la blessure, l'assistance d'un vétérinaire pourra être sollicitée.

A l'issue de ce projet, toutes les vaches et les génisses rejoindront le troupeau général de l'établissement utilisateur, sans conséquences ou séquelles attendues.

17167 L'obésité et le surpoids constituent le 5ème facteur de risque de décès à l'échelle mondiale, avec des conséquences médicales représentant jusqu'à 10% des dépenses de santé. Connaître les mécanismes aboutissant à ces complications est donc un enjeu sociétal, économique et scientifique majeur. L'apparition du surpoids est engendrée par une dérégulation de l'équilibre entre dépenses énergétiques et ingéré alimentaire. La régulation de la prise alimentaire est un phénomène complexe faisant intervenir des signaux en provenance de nombreux organes. De récents travaux ont montré que le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans la régulation de la prise alimentaire. L'objectif de notre projet est de déterminer la relation entre le microbiote intestinal et le comportement alimentaire chez la souris lorsqu'elle est soumise à un régime hyperlipidique. Trois cent quatre vingt souris seront utilisées. Une première étape consistera à tester l'effet de différentes combinaisons d'antibiotiques administrées aux souris dans l'eau de boisson sur leur ingéré alimentaire lors du passage à un régime hyperlipidique. Deux combinaisons d'antibiotiques seront ensuite retenues pour une deuxième étape. Les souris seront sacrifiées soit avant la mise en place d'un régime riche en lipides, soit après (à J2 et J5) ou lors d'exposition répétées d'une semaine afin de prélever le cerveau, les tissus intestinaux et le sang. Les prélèvements serviront à des analyses métabolomiques, hormonales, histologiques et moléculaires. Les fèces des souris seront également prélevées quotidiennement pour une analyse métagénomique du microbiote intestinal. Ce projet respecte la règle des 3R. Remplacement: cette étude de relation entre microbiote, intestin, cerveau et comportement ne peut pas être réalisée *in vitro* ni modélisée *in silico*. Elle nécessite donc l'utilisation d'animaux. Réduction: l'utilisation du modèle souris permet d'étudier les relations intestin-cerveau et les évolutions du microbiote intestinal *in vivo* en lien avec les nombreuses données et méthodologies existantes sur ce modèle. Le nombre d'animaux prévu permet d'effectuer des tests statistiques sans nécessité de répétition ultérieure de l'expérience. Raffinement: l'anxiété liée à l'isolement en cages individuelles des souris sera minimisée par un enrichissement du milieu. Les procédures prévues sont non invasives, les prélèvements de tissus et de sang ayant lieu après la mort et le prélèvement de fèces étant réalisés lors de l'émission naturelle de fèces par la souris. Le suivi quotidien du poids des souris et de leur comportement constitue les points limites de l'expérimentation (prise ou perte de poids excessive par rapport au poids de départ, apathie de l'animal pouvant être due à l'isolement). La souche de souris utilisée est par ailleurs moins sensible à la prise de poids lors d'un régime hyperlipidique. La durée de ce régime (7 jours maximum) permet de limiter voire d'éviter les effets délétères à long terme d'un régime riche en graisses.

17168 Qu'elles soient d'origine infectieuse ou liées à une consommation excessive d'alcool ou à un régime alimentaire riche en graisses, la chronicité de ces maladies du foie augmente considérablement les risques de développement de cancer hépatique, affection préoccupante en termes de santé publique. Afin d'améliorer nos connaissances, notre équipe se consacre à comprendre certains mécanismes qui surviennent lors du développement de ces pathologies du foie, aussi nommées hépatites. Au cours de

ces maladies, les hépatocytes, cellules principales du foie, meurent. Nos travaux cherchent à déterminer par quels mécanismes moléculaires cette mort cellulaire peut survenir. Nous nous intéressons particulièrement à trois mécanismes ou voies de mort cellulaire nommés nécroptose, pyroptose et ferroptose qui semblent être impliqués dans la mort des hépatocytes dans le modèle d'hépatite aiguë que nous utilisons chez la souris. Afin de déterminer l'implication de chacune de ces voies de mort cellulaire nous allons étudier l'impact de leur invalidation sur les lésions hépatiques dans notre modèle d'hépatite aiguë induite par l'injection d'une molécule d'origine végétale (Concanavaline A). Pour invalider la nécroptose, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées qui n'expriment plus la forme active d'acteurs centraux de cette voie de mort cellulaire. Pour invalider de manière concomitante la pyroptose et/ou la ferroptose, nous allons utiliser des agents pharmacologiques qui sont des inhibiteurs spécifiques de ces voies de mort cellulaire et qui peuvent être injectés aux souris.

Dans notre modèle d'hépatite aiguë, la maladie apparaît très vite et est guérie en moins de 2 jours. La durée de l'expérimentation sera donc inférieure à 24h. Les organes prélevés sur les animaux euthanasiés seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique et pour caractériser les mécanismes de mort cellulaire impliqués dans la mort des hépatocytes dans chacune des conditions testées (inhibition d'une, deux ou trois voies de mort cellulaire).

Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué à 736. Il s'agit de souris adultes normales et de souris génétiquement modifiées qui sont élevées dans notre animalerie.

Ce protocole établi suit la règle des 3R :

Remplacer : Nous n'avons aucun moyen de remplacer de telles études par des tests *in vitro*, car elles englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, incluant une inflammation avec migration dans le foie de cellules provenant d'autres parties de l'organisme.

Réduire : Nous réduisons le nombre de souris utilisées au minimum requis pour obtenir une validation statistique des résultats.

Raffiner : L'étude a été raffinée en envisageant un grand nombre de mesures sur les échantillons prélevés au niveau des 2 organes touchés par la maladie pour récolter un maximum d'informations. Les souris seront traitées dans une pièce isolée de leurs congénères sur un temps court. Un anesthésique local sera utilisé dès que possible pour prévenir des douleurs liées aux gestes.

A terme, les données de ce travail pourraient permettre de mieux définir les stratégies de traitement des hépatites auto-immunes, voire d'évaluer l'intérêt d'une thérapeutique basée sur l'inhibition pharmacologique de certaines voies de mort cellulaire programmée.

17169 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) fait partie des cancers les plus mortels et les plus répandus dans la population humaine. Peu d'options thérapeutiques sont disponibles. Dans 9 cas sur 10, le cancer se développe principalement dans les foies déjà malades de patients souffrant d'hépatites aggravées en cirrhose. Ces hépatites peuvent être d'origine virale, ou liées à la consommation excessive d'alcool ou encore de régimes alimentaires riches en graisses. Afin de pouvoir étudier les différents stades de développement de cette maladie, nous disposons d'un modèle chez la souris qui développent un cancer du foie suite à une prise alimentaire trop calorique. Ce modèle combine, chez des souris mâles, l'administration d'un agent chimique pour induire un diabète à une alimentation très riche en lipides. Des données de la littérature scientifique suggèrent que la mort cellulaire par une voie spécifique, nommée nécroptose, survenant au cours de la maladie pourrait influencer son développement. Notre projet est donc d'évaluer le rôle d'un acteur central de cette nécroptose (la protéine MLKL) dans le cancer du foie en comparant le développement de la maladie induite par le traitement/régime alimentaire riche en lipides chez des souris normales et des souris génétiquement modifiées, n'exprimant pas cette protéine MLKL soit dans toutes les cellules de l'animal soit seulement dans les cellules qui se transforment en cellules cancéreuses (les hépatocytes). Pour atteindre le stade cancéreux, le protocole dure 24 semaines, les animaux seront étudiés après 1, 3, 5, 8, 12, 16 et 20 semaines de régime hyperlipidémique pour comparer les évolutions de la maladie chez les différents types d'animaux. Les organes prélevés seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique, les dysfonctionnements métaboliques et l'avancée du cancer. Le nombre de souris

engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 576. Nous avons conçu le protocole en respectant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- 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 un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces.
- Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats ;
- L'étude a été raffinée en engageant un suivi fréquent des souris rendues diabétiques, et en réalisant un grand nombre de mesures sur les différents prélèvements tissulaires afin de récolter un maximum d'informations que nous pourrions corrélérer aux résultats des études partielles menées chez l'homme.

Ce travail permettra de préciser le rôle de la nécroptose au cours de l'évolution de la maladie menant au cancer du foie chez la souris. A terme, les données de ce travail devraient apporter des informations qui pourront être importantes pour la conceptualisation d'une stratégie thérapeutique.

17170 Le DHA est un nutriment indispensable aux fonctions vitales de l'organisme. C'est un acide gras omega 3 particulièrement connu pour ses effets bénéfiques sur les fonctions cérébrales et cardiaques. Cet acide gras est néanmoins fragile parce qu'il s'oxyde très facilement, en raison du grand nombre de ses doubles liaisons. Une des stratégies pour le protéger lors d'un enrichissement alimentaire est de l'encapsuler. Le projet repose donc sur la microencapsulation d'une huile de DHA avec des molécules naturelles, des protéines de lait. L'objectif est de démontrer l'impact de cette protection protéique sur le processus de digestion-absorption, dans le but de favoriser une plus grande assimilation de DHA par l'organisme et ainsi une accumulation cérébrale supérieure. Pour cela, trois lots de 8 rats mâles Wistar âgés de 3 semaines (24 animaux au total) seront nourris, à l'issue d'une semaine d'acclimatation, avec une matrice omelette contenant ou non le DHA microencapsulé. Le lot 1 est un contrôle négatif (omelette sans DHA avec les protéines de lait), le lot 2 est un contrôle positif (omelette avec l'huile de DHA et les protéines de lait) et le lot 3 est le groupe traité (omelette avec DHA émulsionné en protéines de lait). Les animaux seront mis à jeun en début de journée pendant 6 heures puis l'omelette leur sera distribuée sur 3 heures. Les croquettes faites à façon de manière à compenser les apports nutritionnels des œufs, seront ensuite à disposition ad libitum dans chaque cage. Le régime alimentaire sera mis en place pendant 4 semaines, à l'issue desquelles une analyse lipochimique de différents organes sera réalisée.

Remplacer. Le projet est mené *in vivo* parce qu'un modèle *in vitro* n'est pas envisageable pour mesurer l'impact d'une formulation alimentaire sur le dépôt d'un nutriment essentiel dans un organe cible. Des essais de digestion *in vitro* ont néanmoins été réalisés au préalable pour optimiser le design expérimental *in vivo*.

Réduire. L'étude est réalisée sur un nombre suffisant d'animaux pour observer un effet significatif sur l'accumulation de DHA dans les tissus d'intérêt mais un nombre toutefois réduit au nécessaire. Des travaux antérieurs de l'équipe montrent que 8 rats suffisent pour garantir un effet significatif sur un métabolisme d'acide gras lorsque la part lipidique du régime est modifiée.

Raffiner. Enfin, les rats auront un apport nutritionnel équilibré, seront mis à jeun sur une période de faible activité pendant une durée courte, et seront séparés au sein de la même cage avec une cloison en plexiglass lors de la distribution de l'omelette. Une surveillance quotidienne avec notamment la prise de poids journalière des animaux sera effectuée.

17171 La température ambiante est un facteur environnemental qui impacte significativement les performances des porcs quand elle varie au-delà des limites inférieures ou supérieures de leur zone de thermoneutralité. Les vagues de chaleur estivales sont préoccupantes pour les filières animales au regard de leur vulnérabilité face à ce type d'évènements climatiques extrêmes et de l'évolution attendue de la fréquence et de l'intensité de ce type d'évènements climatiques au cours du siècle. Ces vagues de chaleur dont la probabilité d'occurrence a fortement augmenté avec la hausse des températures estivales sous l'effet du changement climatique pourront devenir commun en Europe avec une fréquence qui devrait doubler d'ici 2050. Les vagues de chaleurs ont des effets à court et long termes

sur les performances des animaux. L'objectif de ce projet est de tester des solutions pour réduire ces effets en utilisant des solutions nutritionnelles. Un total de 80 porcs sera utilisé dans cette étude pour mesurer les performances zootechniques, les réponses de thermorégulation et les paramètres sanguins.

Règle des 3R.

Remplacement: Le remplacement n'est pas possible car l'utilisation d'animaux est inhérente au type d'étude (impact de la conduite alimentaire sur les réponses des porcs charcutiers aux vagues de chaleur).

Réduction: Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum statistique en fonction des mesures effectuées.

Raffinement: 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

17172 Avec plus de 400 millions de personnes touchées dans le monde et une incidence qui ne cesse d'augmenter, le diabète constitue un problème de santé publique. Le diabète de type 2, ou insulino-résistant, représente à lui seul plus de 90% des cas de diabète. Il est considéré comme une maladie environnementale car ses principales causes sont l'obésité, la sédentarité et une mauvaise alimentation (trop importante et trop riche). Il se caractérise par une augmentation du taux de glucose dans le sang (la glycémie) et a des conséquences graves sur la santé (cécité, atteintes rénales, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral). Si les mesures hygiéno-diététiques (activités physiques, régime) ne permettent pas un rétablissement à la normale de la glycémie, une prise en charge pharmacologique sera instaurée.

Notre société est spécialisée dans la réalisation d'études précliniques de candidats médicaments. Ainsi, l'objectif de ce projet sera de mettre en évidence l'efficacité de nouveaux composés dans des modèles précliniques chez la souris (mutants ou induits par des régimes gras et/ou sucrés) présentant des troubles de la glycémie et de sa régulation. Cette efficacité sera évaluée sur différents paramètres : prise alimentaire, masse corporelle, dosages sanguins (glycémie, insuline, ...) réalisés après un jeûne ou en réponse à l'administration de sucre ou d'insuline (hormone clé dans la régulation de la glycémie). S'agissant d'une maladie chronique, ces paramètres seront mesurés pendant plusieurs semaines.

La littérature faisant état de nombreux modèles présentant des désordres métaboliques, une étude pilote pourra être réalisée afin de déterminer le meilleur modèle et la dose potentiellement efficace (20 souris).

Chaque évaluation pré-clinique d'un composé constituera une série expérimentale comportant 4 groupes (un groupe « contrôle positif » traité avec un placebo, un groupe « référence » traité avec un composé de référence ayant déjà prouvé son efficacité, 2 groupes « test » traités avec les nouveaux composés candidats à différents dosages). Chaque groupe comporte 12 souris, soit $20 + 48 = 68$ animaux par série expérimentale pour un total de 6 séries sur 5 ans, soit 408 animaux au total.

Ce projet respectera la règle des 3R :

- Remplacement : la régulation de la glycémie implique de nombreux organes et mécanismes physiologiques qui sont sensibles aux paramètres environnementaux. A l'heure actuelle, il est impossible de recréer tous ces facteurs dans des modèles *in vitro*. Les souris présentant des mécanismes de régulation de la glycémie très proches de ceux de l'humain, elles constituent un modèle de choix pour des études d'efficacité de candidats médicaments dans des pathologies causant des dérégulations de la glycémie.

- Réduction : si nécessaire, des études pilotes (nombre d'animaux restreint) seront réalisées afin de mieux délimiter le projet à grande échelle (choix du modèle et des doses à tester). Pour le projet, le nombre d'animaux par groupe est à la fois nécessaire et suffisant pour s'assurer de la robustesse des tests statistiques réalisés à la fin du projet et de garantir au sponsor la preuve de concept attendue.

La réalisation des mesures et des prélèvements chaque semaine permet d'obtenir un suivi (chaque souris pourra être son propre contrôle) et ainsi d'obtenir des données à différents temps sans multiplier les groupes d'animaux.

- Raffinement : les souris seront hébergées par 2 ou 3 (selon la réglementation en vigueur) en présence d'enrichissement (igloo, coton, bois, ...). Elles seront manipulées régulièrement afin de réduire le stress au moment des expérimentations. Pour les prélèvements de sang effectués à la queue, une crème anesthésique sera appliquée au préalable afin de prévenir la douleur occasionnée. A l'issue de chaque prélèvement, une attention particulière sera apportée aux animaux pour s'assurer de leur bonne récupération.

17173 Les maladies métaboliques telles que le diabète et l'obésité jouent des rôles délétères sur le système nerveux central. Ils entraînent entre autres une perte de la plasticité cérébrale (neurogenèse) qui se traduit par l'apparition de troubles cognitifs et comportementaux, constituant un facteur de risque pour le développement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Ces maladies métaboliques entraînent une diminution de l'activité des cellules souches neurales adultes probablement en lien avec une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation.

Des données récentes de la littérature suggèrent que les cellules souches pourraient exprimer les récepteurs aux lipoprotéines de haute densité (HDL). Ainsi les HDLs pourraient être des vecteurs possibles pour délivrer spécifiquement des molécules à ces cellules souches. Parmi ces molécules, celles issues de la biodiversité végétale, sont de plus en plus étudiées car elles possèdent des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et neuroprotectrices.

Aujourd'hui, il est important de trouver de nouvelles molécules capables d'activer les cellules souches pour favoriser la création de nouveaux neurones par ces dernières (neurogenèse). Les HDLs peuvent constituer de bons vecteurs pour délivrer ces molécules. Ainsi, dans le cadre de cette étude, l'objectif est de déterminer les capacités neurogéniques de 5 composés issus de la biodiversité végétale, vectorisés ou non par des HDLs (afin de mieux cibler les cellules souches neurales). Pour y parvenir, nous allons utiliser des poissons zèbres (*Danio rerio*) qui sont des modèles reconnus de neurogenèse et des modèles reconnus de physiopathologies humaines.

Ces expériences pourraient permettre de mieux comprendre l'impact de ces composés (vectorisés ou non) sur la création de nouveaux neurones dans le cerveau adulte et permettre de favoriser la plasticité cérébrale dans des désordres métaboliques ou neurodégénératifs chez l'Homme.

Dans ce contexte, nous souhaitons effectuer des injections intracérébroventriculaires du

- solvant contrôle (solution saline): 10 poissons analysés à 24h et 10 à 48h après injection
- HDL: 10 poissons analysés à 24h et 10 à 48h après injection
- composé 1 non vectorisé: 10 poissons analysés à 24h et 10 à 48h après injection
- composé 2 non vectorisé: 10 poissons analysés à 24h et 10 à 48h après injection
- composé 3 non vectorisé: 10 poissons analysés à 24h et 10 à 48h après injection
- composé 4 non vectorisé: 10 poissons analysés à 24h et 10 à 48h après injection
- composé 5 non vectorisé: 10 poissons analysés à 24h et 10 à 48h après injection
- les composés 1 à 5 vectorisés par des HDL: 50 poissons analysés à 24h et 50 à 48h après injection

A l'issue de ces expérimentations, des analyses histologiques et biochimiques seront effectuées pour étudier l'impact de ces traitements sur la neurogenèse.

Un nombre total maximum de 240 poissons sera utilisé.

Cette étude répond aux 3R

Remplacement : Il semble indispensable de passer au modèle animal pour mieux comprendre les effets *in vivo* de ces molécules sur la neurogenèse.

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, ANOVA). Un premier lot de poisson sera injecté pour une analyse à 24h. Si ce temps de cinétique est suffisamment intéressant pour étudier l'ensemble des paramètres à analyser, ou si une toxicité insoupçonnée s'avèrait se mettre en place, il

n'y aura pas d'injection pour analyse à 48h. De plus, chaque groupe de 10 poissons sera injecté comme suit : 2 x 3 poissons + 4 poissons.

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. Toute manipulation invasive sera suivie d'une anesthésie générale, et tout signe de souffrance sera étudié afin de prendre les mesures adéquates

Les points limites incluant une locomotion altérée, une prise alimentaire altérée ou une coloration foncée seront pris en considération car témoignant d'un stress et/ou d'une souffrance. Ils seront rapportés au vétérinaire pour prendre les mesures adaptées (dont euthanasie).

A noter que le nombre théorique de 240 ne sera très certainement pas atteint si ces les données recueillies sont suffisamment solides. Ces expériences pourraient permettre de mieux comprendre l'impact de ces composés (vectorisés ou non) sur la création de nouveaux neurones dans le cerveau adulte et permettre de favoriser la plasticité cérébrale dans des désordres métaboliques ou neurodégénératifs chez l'Homme.

17174 Notre laboratoire développe des polymères chirurgicaux biocompatibles pour différentes applications cliniques. L'une des principales propriétés de nos polymères est d'adhérer à différents tissus biologiques et d'être efficaces sur une longue période (plusieurs semaines à plusieurs mois). Un premier produit a déjà été évalué en clinique pour son utilisation en tant qu'adjuvant aux sutures, dans le cadre de chirurgies de reconstruction vasculaire.

Dans le cadre de la présente demande, deux projets sont prévus en parallèle:

1/ évaluation de la capacité de ces polymères à adhérer à la muqueuse nasale et à délivrer des molécules thérapeutiques pour des applications ORL sur le long terme. 4 molécules seront testées. Procédure endoscopique.

2/ évaluation de la capacité de ces polymères à adhérer au péritoine, pour la fixation de plaques nécessaires à la réparation tissulaire dans le cadre de la chirurgie endoscopique relative aux hernies ventrales et inguinales. Intérêt à éviter l'utilisation de sutures, agrafes ou clips employés dans ce type de chirurgie.

Pour ces deux projets les animaux seront suivis durant 9 mois pour pouvoir évaluer la biocompatibilité des biomatériaux. Des prélèvements de tissus seront effectués après euthanasie des brebis, pour quantifier la libération des molécules délivrées et analyser les tissus. Des tests mécaniques de contrainte au cisaillement seront réalisés sur la zone d'implantation de la plaque de renforcement.

Afin de générer les résultats souhaités, le mouton a été choisi comme modèle expérimental pour sa pertinence et, notamment, ses similitudes anatomiques/morphologiques avec l'Homme concernant la cavité nasale (pour être au plus proche de l'application finale).

Les projets s'étaleront sur 5 ans et nous utiliserons un total de 18 animaux. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain :

a) Remplacement : Les polymères qui seront testés doivent être validés par une expérimentation animale qui ne peut pas être remplacée par un simulateur ou un modèle *in vitro*.

b) Réduction : le nombre d'animaux à utiliser a été rationalisé au maximum en tenant compte des analyses statistiques qui seront effectuées. De plus, chaque animal sera utilisé pour évaluer la capacité des polymères à adhérer de manière efficace à la fois à la muqueuse nasale ainsi qu'aux tissus biologiques dans la région du péritoine.

c) Raffinement : une pré-sélection des produits à tester sera effectuée avant les études. De plus, les procédures chirurgicales décrites sont faites sous anesthésie générale avec antalgiques systématiques et prennent en compte le temps de récupération des animaux et un nombre d'essais visant à réduire leur stress, fatigue et souffrance.

17175 Le système immunitaire est l'ensemble des éléments du corps (barrières physiques/chimiques et cellules immunitaires spécialisées) qui surveille et détruit les cellules anormales. Malheureusement les cellules cancéreuses arrivent souvent à passer outre le système immunitaire. L'immunothérapie a été

développée ces dernières années avec pour objectif de réactiver le système immunitaire contre les tumeurs et de très bons résultats cliniques ont été rapportés.

L'une des principales modalités de traitement dans l'immunothérapie du cancer a été la thérapie cellulaire adoptive ie l'utilisation thérapeutique de cellules immunes propres du patient. En utilisant cette approche, des lymphocytes T qui reconnaissent spécifiquement la tumeur sont ainsi perfusés chez des patients cancéreux dans le but de reconnaître, de cibler et de détruire des cellules tumorales. L'immunothérapie cellulaire a montré récemment des résultats extrêmement prometteurs en utilisant des cellules modifiées, en particulier des cellules T portant un récepteur d'antigène chimérique (CAR-T), particulièrement dans le cas des cancers hématologiques (certains lymphomes et leucémies), mais des résultats moins encourageants ont été observés dans le cas des tumeurs solides. Ces CAR-T expriment une molécule à leur surface qui les rend particulièrement efficaces dans l'identification et l'élimination des cellules cancéreuses

Dans ce projet, nous allons génétiquement modifier les lymphocytes T afin de les rendre plus efficaces contre les tumeurs solides.

Remplacement : 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. En effet les expériences *in vivo* permettent d'évaluer la circulation des cellules modifiées jusqu'à la tumeur, ainsi que leur persistance et les interactions avec les autres cellules présentes chez l'animal. Par conséquent, les réponses anti-tumorales seront analysées chez des souris avec des tumeurs humaines et traitées avec des cellules modifiées artificiellement en laboratoire.

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.

Réduction : Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaires faisant l'objet de la présente demande sera de 5200 souris. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés (taille des groupes expérimentaux, approche par étape afin d définir le meilleur modèle d'étude), tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus.

Raffinement : En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être, le recours à une analgésie appropriée permettra une prévention adéquate de la douleur, et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux selon des points limites listés dans la grille de score jointes.

17176 La majorité des mélanomes (cancer des mélanocytes) exprime une mutation spécifique, B-RAF-V600E, qui joue un rôle primordial dans le développement du cancer. L'expression de cette mutation provoque une prolifération initiale des mélanocytes qui est limitée toutefois par un mécanisme intracellulaire conduisant à un arrêt de la prolifération en forme de "grain de beauté" visible sur la peau. Ce mécanisme, appelé "sénescence induite par l'expression d'un oncogène", empêche le développement d'une tumeur. Normalement, les mélanocytes formant un grain de beauté sont bloqués de façon durable. Néanmoins, à des fréquences faibles, un échappement de la sénescence survient qui conduit à la formation d'un mélanome avec des conséquences potentiellement graves au niveau de la santé. Notre équipe étudie *in vitro* les mécanismes pouvant permettre un échappement de cette sénescence. Nous avons observé sur des cellules en culture que des glucocorticoïdes peuvent fortement inhiber l'entrée en sénescence provoquée par l'expression de B-RAF-V600E. Les glucocorticoïdes sont couramment utilisés comme agents anti-inflammatoires en santé humaine. Notre observation *in vitro* soulève la possibilité que l'utilisation des glucocorticoïdes pourrait augmenter le risque de développer un mélanome. Toutefois, il est difficile de savoir si nos conditions de culture *in vitro* reflètent bien l'état physiologique et la réponse des mélanocytes *in vivo*. Pour cette raison, nous voudrions évaluer la possibilité que le traitement de la peau avec un glucocorticoïde puisse augmenter le risque de mélanome. Nous avons à notre disposition un modèle murin nous permettant d'exprimer l'oncogène B-RAF-V600E spécifiquement dans les mélanocytes de la peau. Comme chez l'homme, l'expression de B-RAF-V600E dans les mélanocytes de la souris conduit à la production indolore de grains de beauté

qui n'évoluent que très rarement en mélanomes. Nous utiliserons une cohorte de 90 souris (45 mâles et 45 femelles). L'expression de B-RAF-V600E sera induite dans les mélanocytes de toutes ces souris, mais la moitié recevra au même temps une application de glucocorticoïde sur la peau. Nous suivrons visuellement le nombre et la taille des grains de beauté qui apparaissent sur la peau, ainsi que leur fréquence d'apparition.

Les animaux seront issus d'un élevage autorisé spécialisé. Dans notre modèle, chaque souris développe des dizaines de grains de beauté. 90 souris en tout devraient donc nous permettre d'avoir un échantillon statistique suffisant pour savoir si l'application des glucocorticoïdes augmente le risque de progression de grains de beauté vers le mélanome.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long du projet. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance aux animaux lors de leur mise en œuvre. Dès le moindre signe de souffrance, le vétérinaire de l'installation interviendra pour la réduire. Des critères d'arrêt ont été définis et seront appliqués dans l'éventualité où le bien-être d'un animal ne pourrait plus être garanti. Notamment, si nous constatons l'apparition de mélanomes, nous euthanasierons la souris afin d'empêcher la progression de la maladie et la souffrance de l'animal.

17177 Les allergies alimentaires sont un problème majeur de santé publique. Elles résultent d'une réponse immunitaire inappropriée et excessive contre certaines protéines alimentaires, alors appelées des allergènes. Ces allergènes alimentaires devraient être tolérés, car ils sont inoffensifs et ils participent, en tant que nutriments, au fonctionnement et à la croissance de l'organisme. L'allergie alimentaire résulte ainsi de l'absence d'une « tolérance orale », que l'on cherche à rétablir au cours des protocoles de « désensibilisations ».

Une augmentation constante de la prévalence et de la sévérité des allergies alimentaires est observée dans les pays industrialisés depuis plus de 20 ans, démontrant le rôle de facteurs non génétiques dans cette pathologie. De plus, les allergies alimentaires sont plus fréquentes chez le jeune enfant. Différents facteurs environnementaux peuvent donc agir dès le plus jeune âge, voire pendant la grossesse, et favoriser le développement ultérieur de cette pathologie. Ces facteurs peuvent notamment interférer avec la maturation de la muqueuse intestinale et du système immunitaire, et avec la mise en place et la fonction de la flore intestinale (microbiote intestinal), les deux étant étroitement liés. Un défaut de l'un de ces paramètres peut en effet être déterminant dans la propension du nouveau-né à développer, plus tard dans la vie, une allergie alimentaire.

Le but de ce projet est donc d'étudier l'effet de certains facteurs environnementaux appliqués en période périnatale sur ces différents paramètres dans la descendance, et leur lien avec la propension à développer une allergie alimentaire ou au contraire une tolérance orale. Nous étudierons plus particulièrement l'exposition à un stress « psychique » (séparation maternelle) et à des stress chimiques (expositions à un additif alimentaire et à un agent biocide présent dans l'environnement domestique). Certains de ces facteurs seront combinés, afin d'évaluer un potentiel « effet cocktail », et les mécanismes sous-jacents seront étudiés.

Ces travaux sont basés sur la littérature pour l'identification de facteurs pertinents, mais ils ne cherchent pas à reproduire des travaux déjà réalisés. Ils permettront d'enrichir la connaissance scientifique sur les facteurs environnementaux périnataux favorisant le développement des allergies alimentaires, aidant ainsi à établir des politiques publiques de prévention efficace. Ils fourniront également des modèles intéressants pour l'analyse d'autres facteurs périnataux pouvant favoriser, ou au contraire protéger, des allergies alimentaires.

Aucun modèle *in vitro* n'est disponible pour tester l'impact de ces facteurs périnataux sur la descendance : ces effets résultent en effet du passage transplacentaire/dans le lait maternel d'une information (stress chimique appliqué, molécules ou cellules inflammatoires en résultant...), et/ou d'un comportement impactant la mise en place *in utero* puis en période néonatale du système immunitaire et du microbiote intestinal chez le petit – les deux étant étroitement liés. L'impact de ces maturations altérées ne se révéleront que plusieurs semaines plus tard, sur la capacité à induire une tolérance ou au contraire une allergie alimentaire. Cette étude nécessite donc l'utilisation d'un modèle animal permettant d'analyser de façon intégrative ces différents facteurs. Elle repose sur l'utilisation d'un

modèle mère-enfant et d'un modèle expérimental d'allergie alimentaire/de tolérance orale induite chez le rongeur femelle, modèles déjà en place au sein de notre laboratoire. Selon les effets observés *in vivo*, des effets doses et des études mécanistiques *in vitro* complèteront les travaux, permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux tout en approfondissant la connaissance scientifique.

Les rongeurs parents, issus d'un établissement agréé, puis la descendance seront hébergés en groupe pour respecter leur mode de vie, et en présence de différents éléments d'enrichissement (sous la forme de sopalin et de cabane type boîte à œuf). Les accouplements et les naissances seront réalisés dans notre établissement. Les facteurs environnementaux étudiés seront appliqués sur la mère gestante et/ou allaitante, par un personnel expérimenté. L'effet de ces facteurs sur la composition et la fonction du microbiote, sur le métabolisme global des petits et sur leur statut immunitaire sera étudié chez les mâles, par prélèvement de fèces à différents temps, puis prélèvement de plasma et d'organes lymphoïdes d'intérêt à 4 semaines de vie (une semaine après le sevrage). La tolérance orale puis l'allergie seront induites dans la descendance femelle à partir de 4 semaines, par administration orale d'un aliment allergénique cliniquement pertinent (lait de vache), en présence ou non d'un adjuvant pro-allergique. L'intensité de l'allergie induite, et sa modulation par les facteurs appliqués pendant la fenêtre périnatale, sera analysée par la mesure des anticorps et de différents paramètres biochimiques présents dans le plasma, et par l'analyse de différents paramètres cellulaires mesurés après l'euthanasie des animaux. Des analyses de la composition et de la fonction du microbiote seront également réalisées au cours du temps sur les fèces de ces mêmes souris.

Les méthodes expérimentales, classiquement utilisées et validées au sein de notre établissement, ont été choisies pour limiter au maximum toute souffrance lors de leur mise en œuvre. Elles ne provoquent pas d'atteinte de point limite pouvant nécessiter un arrêt de l'expérience. L'état de santé des animaux sera contrôlé suite à toutes les manipulations réalisées, et l'état général et le poids des animaux seront contrôlés de façon indépendante hebdomadairement, par une équipe formée et soucieuse du bien-être animal. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée à la moindre détection d'un signe de souffrance (arrêt de l'expérimentation en cas de souffrance de l'animal). Une attention particulière sera portée aux mères gestantes et allaitantes, et aux nouveaux nés (surveillance quotidienne).

Le nombre de 758 rongeurs (268 issus d'un établissement fournisseur/ 490 obtenus dans l'établissement utilisateur), répartis en 3 procédures expérimentales, et incluant des contrôles positifs et négatifs pour chaque procédure, correspond au minimum nécessaire pour obtenir des données interprétables et garantir l'interprétation scientifique des résultats. Des tests statistiques combinant des analyses multivariées intégrant les différents paramètres dosés sur chaque animal, puis des analyses univariées (non paramétrique), seront réalisés selon une stratégie statistique rigoureuse et non biaisée.

17178 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.

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.

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 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. 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 pour cette étude 120 souris mâles, au maximum.

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).

Des anesthésiques peu impactant (isofluorane, 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.

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.

17179 L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle dans la douleur spontanée chez la souris porteuse d'une mutation qui a été identifiée comme associée à des syndromes douloureux chroniques chez l'Homme. Cette mutation est présente dans le gène SCN9A et cause des douleurs intenses et spontanées telles que des sensations de brûlure et de démangeaisons au niveau des bras et des jambes. Jusqu'à maintenant les traitements prescrits aux patients restent très peu efficaces, ce qui nécessite d'effectuer des recherches plus avancées dans le but de mieux comprendre l'effet de cette mutation sur la sensation douloureuse. La grande similarité entre les systèmes nerveux qui contrôlent la douleur chez la souris et chez l'homme fait du modèle souris un modèle idéal pour l'étude de ces maladies et pour comprendre les phénomènes biologiques qui y sont associés.

Remplacement : Dans le but de remplacer l'utilisation des souris, des méthodes alternatives ont été effectuées antérieurement et ont montré que ces mutations induisent un fonctionnement trop important de la protéine codée par ce gène. Ceci suggère que la protéine mutée qui fonctionne de manière excessive est responsable de l'hypersensibilité chez les malades. Et maintenant pour aller plus loin, la sensation douloureuse ne peut pas être évaluée seulement par des études *in vitro*, mais nécessite d'être évaluée dans un modèle de souris, ce qui rend le remplacement par une méthode alternative inutile à notre stade.

Réduction : Nous utiliserons 137 souris au total. Cet effectif est approprié pour les études comportementales sur les souris mutées pour ce gène et est suffisant pour montrer une différence statistique entre le groupe muté et non muté, si elle existe. En effet ce nombre est calculé pour détecter une différence de 20% avec une variation vers augmentation de la sensibilité douloureuse, et les expériences effectuées dans deux cohortes indépendantes afin de vérifier la reproductibilité des résultats de ces expériences de comportement.

Raffinement : La souris est de nos jours le modèle de choix largement utilisé pour l'évaluation des mutations humaines dans des modèles de rongeurs. La création de souris mutantes par le nouveau

système génétique qu'on utilise est plus avancée chez la souris que chez le rat, et notre projet est financé par un contrat européen pour la création de la mutation chez la souris. Le phénotype de ces souris mutantes n'est pas encore connu puisque leur étude n'a pas été publiée jusqu'à présent, cependant afin d'éviter toute souffrance inutile, les souris feront l'objet d'un suivi rapproché et des points limites éthiques sont définis. En cas de nécessité, des décisions seront prises en accord avec la vétérinaire et/ou la SBEA de l'institut pour stopper tout signe de souffrance ou de mal-être de l'animal. Les animaux seront euthanasiés en cas d'une perte de poids supérieure à 20% et/ou de critères de souffrance importante. Les animaux (souris) sont hébergés de 3 à 5 par cage. Chaque cage est enrichie avec de la frisure pour faire un nid, ainsi qu'avec un morceau de bois.

17180 Les larves d'insectes sont naturellement consommées par les volailles et constituent d'un point de vue nutritionnel, une matière première intéressante dans leur alimentation. Dans un contexte d'élevage durable, où l'on cherche à utiliser des matières premières locales (notamment pour les ressources protéiques), les larves d'insectes sont une alternative intéressante au tourteau de soja. A l'heure actuelle, les études qui portent sur l'utilisation d'insectes en alimentation des volailles, considèrent des farines d'insectes, qui sont utilisées comme n'importe quelle matière première et incorporées à des granulés. Outre l'aspect nutritionnel, l'utilisation de larves d'insectes entières et vivantes peut aussi avoir un rôle d'enrichissement du milieu et donc jouer sur le comportement et le bien-être des animaux. Il paraît donc intéressant de pouvoir nourrir les animaux avec des larves vivantes, ce qui 1) se rapproche de leur comportement naturel, 2) procure un enrichissement du milieu et 3) constitue un produit intéressant d'un point de vue nutritionnel. L'utilisation d'une matière première en alimentation requiert de connaître sa valeur nutritionnelle afin de pouvoir adapter les apports aux besoins nutritionnels des animaux. Les études disponibles dans la littérature portant sur des farines, aucune donnée de valeur nutritionnelle n'est disponible pour les larves d'insectes vivantes. Par ailleurs, les protocoles *in vivo* permettant de déterminer la valeur nutritionnelle d'une matière première sont des protocoles standardisés mais nécessitent de connaître à minima le comportement d'ingestion et de digestion. Ces éléments sont connus pour des aliments granulés mais aucune donnée n'est disponible pour les larves d'insectes vivantes. Afin de pouvoir définir le protocole à mettre en oeuvre pour la caractérisation de la valeur nutritionnelle, des connaissances sur le comportement d'ingestion et la dynamique de digestion des larves vivantes doivent être acquises. Cet essai est donc une étape préliminaire primordiale avant la caractérisation de la valeur nutritionnelle de cette nouvelle matière première. Ainsi, l'objectif de cet essai est d'acquérir des informations sur la dynamique d'ingestion et de digestion de larves d'insectes entières vivantes par des poulets de chair mâles. Pour cela, 200 poulets mâles de type Ross 308 (souche commerciale classiquement utilisée en élevage) seront élevés de 1 à 29 jours d'âge. Ils seront élevés au sol pendant les deux premières semaines puis en cages individuelles jusqu'à la fin de l'étude. Les animaux recevront un régime standard permettant de couvrir leurs besoins pendant la première semaine. L'aliment expérimental sera introduit progressivement lors de la deuxième semaine afin de faire une phase de transition permettant aux animaux de s'habituer à l'aliment expérimental. A partir de la 3ème semaine (J17), les animaux recevront 100% du régime expérimental jusqu'à la fin de l'étude. A 29 jours, les animaux seront mis à mort selon une cinétique (0, 1h, 2h30, 4h après fin d'alimentation) et les prélèvements réalisés permettront d'acquérir des informations sur la physiologie digestive et notamment sur le temps nécessaire à l'animal afin d'avoir du contenu digestif dans tous les segments du tractus digestif.

Tout au long de l'étude la règle des 3 R sera respectée :

Remplacement : Aucun modèle autre que l'animal (espèce cible) ne peut être utilisé pour étudier le comportement d'ingestion et de digestion.

Réduction: Au final, il y aura 9 animaux par régime alimentaire et temps de cinétique. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en sachant qu'il existe une variabilité individuelle que ce soit pour le comportement ou pour la digestion.

Raffinement : Les animaux seront élevés au sol avant une phase en cage individuelle, indispensable pour pouvoir enregistrer leur consommation d'aliment et réaliser une collecte totale de fientes. Les cages individuelles sont équipées de grilles permettant un contact visuel et olfactif avec les congénères, le sol des cages est adapté à la taille et au poids des animaux et les cages sont équipées de jouets

suspendus à picorer. Les animaux seront visités au moins 3 fois par jour pour la distribution de larves. Le calendrier des pesées et les mises à jeun nécessaires au bilan (collecte totale de fientes) et aux prélèvements terminaux ont été réfléchis de manière à éviter les mises à jeun répétées.

17181 En vieillissant, l'organisme accumule des cellules potentiellement toxiques pour l'organisme appelées « cellules sénescentes » ou CS.

L'impact des CS sur le corps reste incompris mais réduirait l'espérance de vie en favorisant l'apparition de différentes pathologies liées à l'âge comme l'athérosclérose, la prise de poids ou le diabète. Par conséquent, il est supposé que la délétion des CS et leurs remplacements par des cellules jeunes et parfaitement fonctionnelles augmenterait l'espérance de vie et diminuerait les comorbidités associées à l'âge.

Paradoxalement, il a été démontré que certaines CS ont un rôle structural important : bien que néfaste pour les tissus, leur disparition est plus dommageable que leur maintien si elles ne peuvent être remplacées. Or, il a été démontré que la disparition des cellules endothéliales sénescentes conduit à de la fibrose et à des dommages dans le système circulatoire hépatique.

Nous postulons donc qu'en vieillissant, l'organisme perd progressivement sa capacité à remplacer ses cellules sénescentes par de jeunes cellules pleinement fonctionnelles. Néanmoins, en augmentant artificiellement la capacité de remplacement cellulaire de l'organisme, nous permettrions aux tissus de remplacer les CS après les avoir préalablement éliminés.

L'objectif de ce projet est de contribuer à confirmer ces théories. Il permettra d'aider à la compréhension des pathologies liées au vieillissement, mais aussi d'envisager un moyen de les soigner.

Ce projet repose sur le recours à plusieurs modèles murins transgéniques relativement complexes : En effet, une partie des transgènes portés par les souris doit permettre de cibler les LSECs sénescentes tandis qu'une autre partie doit dans les mêmes souris favoriser le renouvellement cellulaire.

Les transgènes ciblant les LSECs sénescentes pourront soit permettre la production d'un marqueur fluorescent nommé GFP (modèle 1, pour marquer les CS), soit permettre la production d'un élément toxique, nommée DTA (modèle 2, pour tuer les cellules sénescentes). Le modèle 1 n'est pas dommageable mais le n°2 pourrait avoir un impact sur la santé de l'animal durant son vieillissement. Il fera l'objet d'un suivi particulier décrit plus loin. Les 2 modèles s'expriment par défaut dès qu'une cellule devient sénescente.

A ces transgènes DTA ou GFP s'ajouteront les transgènes devant favoriser le renouvellement cellulaire. Nous en testerons 2 types : le transgène iTert et le transgène i4F. On aura ainsi le modèle 1+iTert ou le modèle 1+i4F, ou encore le modèle 2+iTert ou le modèle 2+i4F. Les systèmes iTert et i4F sont inductibles et nécessiteront une activation par la doxycycline. Celle-ci est fréquemment utilisée pour induire des transgènes dans des modèles murins et n'est pas toxique. En absence de doxycycline, les différents facteurs de renouvellement ne s'expriment pas. Aucun phénotype dommageable n'est associé à iTert, mais une induction continue i4F pendant 2,5 à 3 semaines peut mener à l'apparition d'une tumeur nommée tératome pour 75-80% des souris traitées. Ces tératomes se développent principalement à partir du pancréas, du rein, de l'intestin ou du tissu adipeux en des laps de temps très variables allant de 3 à 10 semaines après le début de l'induction.

Dans notre cas, étant donné que nous souhaitons limiter au maximum et même supprimer le développement de ces tératomes, les souris ne seront traitées que 3 jours par mois à une faible dose de doxycycline (10 fois inférieure à la dose généralement utilisée) pendant 6 à 12 mois.

Enfin, un autre traitement sera réalisé 1 heure avant le sacrifice d'une partie des souris et consistera à les injecter en intraveineuse avec de l'Évans Blue, un colorant permettant de tester la perméabilité vasculaire et n'induisant pas de douleur chez la souris. À l'exception de ces traitements, le projet consistera à laisser nos différents modèles murins vieillir jusqu'à des âges précis.

Les animaux seront gardés en vieillissement en animalerie, et euthanasiés aux âges de 12 mois et 18 mois.

Prise en compte des 3R :

- Raffinement : l'état de santé des animaux sera apprécié au moins 1 fois par semaine lors d'un examen approfondi avec recherche de symptôme clinique. Une feuille de score a été construite afin de recenser les symptômes/dommages pouvant apparaître sur l'animal et de déterminer si l'état de santé de l'animal permet de continuer l'expérience ou doit être arrêté (point limite). Les souris « i4F » traitées à la doxycycline et les souris DTA étant susceptibles de présenter un phénotype dommageable auront leurs propres feuilles de score et seront suivis 2 fois par semaine, mais également pesées 1 fois par 2 semaines.

- Remplacement : certaines expériences seront précédées par des cultures *in vitro* de cellules endothéliales. Cela permettra de diminuer le nombre d'expériences *in vivo*, car une seule souris permet d'obtenir assez de cellules endothéliales pour plusieurs expériences.

Néanmoins ces expériences *in vitro* restent très limitées dans leur capacité à répondre aux questions du projet.

- Réduction : des efforts seront faits pour limiter le nombre de souris nécessaires par groupe, par exemple en utilisant les règles statistiques adéquates associé au logiciel gpower et en pratiquant des tests *in vitro* si possible. En se basant sur la littérature déjà existante et en prenant en compte les exigences de réduction, nous constituerons des groupes expérimentaux composés au maximum de 20 animaux. Pour cette étude de vieillissement, nous aurons besoin de 480 souris sur 3 ans.

17182 Le cancer gastrique est la 3e cause de mortalité par cancer dans le monde. La prise en charge est basée uniquement sur de la chirurgie associée à de la chimiothérapie. Cependant, une proportion de cellules appelées cellules souches cancéreuses (CSC) sont résistantes à ces traitements et sont à l'origine des rechutes tumorales et du développement des métastases. Ainsi, une meilleure caractérisation des CSC et une meilleure compréhension de leur mécanisme permettraient de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter le cancer gastrique qui reste de très mauvais pronostic.

Nous souhaitons vérifier si l'expression de certaines protéines par les CSC sont à l'origine des propriétés migratrices de ces cellules. Nous voulons également tester l'efficacité de plusieurs molécules qui agissent sur des CSC qui sont à l'origine du développement de ces cancers. Nous allons tester un ensemble de molécules déjà utilisées en médecine humaine pour des applications autres que les cancers gastriques. Nous demandons pour l'ensemble de l'étude 1200 animaux sur les 5 prochaines années.

REPLACEMENT : Il nous est impossible de remplacer les expériences menées *in vivo* par des études *in vitro* ou *in silico*. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour étudier l'effet d'un traitement dans un contexte tumoral en prenant en compte la physiologie animale.

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. Dans le but de restreindre le nombre d'animaux, nous utiliserons des tests statistiques adaptés et nous combinerons les lots témoins.

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 suivis par l'expérimentateur (pesée, aspect de l'animal) et des soins sont mis en place en cas de mal être.

17183 Ce protocole d'étude vise à étudier le rôle d'une lectin-like de type C, CLEC-1 dans l'immuno-régulation et notamment dans la réponse immune anti-tumorale. En effet, la recherche de nouvelles molécules impliquées dans les processus de tolérance en transplantation, a permise l'identification de la molécule CLEC-1 dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. L'étude des mécanismes associés à la tolérance représente des enjeux médicaux et économiques cruciaux. Nous avons préalablement montré chez le rat et l'Homme que CLEC-1 présente des propriétés immuno-régulatrices dans les cellules dendritiques. En effet, CLEC-1 réduit la capacité des cellules dendritiques à stimuler

la réponse effectrice des LT CD4+ notamment les Th17 et Th1. Ces résultats suggèrent que CLEC-1 pourrait agir comme récepteur inhibiteur dans les cellules dendritiques en inhibant la réponse T effectrice et la polarisation Th17 et Th1. Ceci est d'un enjeu crucial car les réponses Th17 et Th1 sont impliquées dans le rejet de greffe mais aussi dans les maladies auto-immunes et de nombreuses maladies inflammatoires. Au contraire, bloquer CLEC-1 permettrait d'amplifier une réponse Th1 et Th17 et une meilleure réponse anti-tumorale. La molécule CLEC-1 pourrait donc servir d'outil thérapeutique pour inhiber ou augmenter cette réponse Th17 et Th1. Il s'avère donc important d'étudier de façon plus approfondie la fonction de cette molécule dans des modèles *in vivo* chez le rongeur. Nous avons précédemment montré que l'absence de CLEC-1 dans un modèle orthotopique d'Hépatocarcinome (Hepa1.6), permet une prolongation de la survie des souris et augmente la réponse immune anti-tumorale. De plus, nous avons également observé dans le modèle sous cutané d'adénocarcinome du colon (mc38) que l'absence de CLEC-1 en combinaison avec la chimiothérapie cyclophosphamide diminue la croissance tumorale et permet une prolongation de survie des souris.

De ce fait, afin de mimétiser l'effet de l'absence de CLEC-1 chez les souris et d'étudier le rôle de ce récepteur chez l'homme, nous avons développé des souris CLEC-1 KI, qui se composent du domaine extra-cellulaire de CLEC-1 humain, ainsi que des anticorps bloquants humains anti-CLEC-1. Il est nécessaire d'étudier ce que fait le blocage de CLEC-1 dans la réponse antitumorale via des souris hCLEC-1 KI pour envisager de développer des outils thérapeutiques chez l'Homme. Il est donc nécessaire d'avoir recours à un modèle animal ressemblant à ce qui se passe chez l'Homme dans le développement tumoral pour tester l'implication d'une molécule. Il est également nécessaire d'avoir accès aux organes lymphoïdes secondaires et à la tumeur pour étudier les mécanismes liés au blocage de cette molécule CLEC-1 dans la réponse antitumorale. Notre modèle d'étude sera donc des souris (au nombre de 400 au total) hCLEC-1 KI chez lesquels nous projetons d'implanter des cellules tumorales et d'observer leur croissance et leur survie.

Nous respecterons strictement la règle des 3R, afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés par groupe étudié. Les animaux seront hébergés dans l'animalerie selon les normes qui leur sont propres afin de ne pas ajouter un stress supplémentaire au protocole utilisé. Les animaux seront suivis tous les jours, afin de détecter le plus précocement une douleur et d'y mettre un terme, soit par traitement antalgique, soit par sacrifice de l'animal notamment si la taille de la tumeur devient trop importante et si la souffrance ne peut pas être contrôlée et ce afin de ne pas biaiser les résultats.

17184 L'adénocarcinome pancréatique (ADKP) représente l'un des cancers les plus meurtriers au monde dont l'agressivité explique le très faible pourcentage de survie de 5% sur une période de 5 ans. L'agressivité de l'ADKP est telle que la majorité des patients décède dans les 6 mois qui suivent le début de leur prise en charge médicale. Cela est expliqué en partie par le fait que plus de 80% des patients sont, au moment du diagnostic, à un stade localement avancé ou métastatique de la maladie, éliminant la possibilité d'une intervention de résection chirurgicale, seule option curative à ce jour. La progression tumorale repose sur la mise en place d'une flexibilité métabolique complexe gouvernant l'adaptation des cellules cancéreuses à un environnement dénutri auquel elles doivent faire face. Ce remodelage métabolique intervient également lors du processus métastatique permettant aux cellules cancéreuses de solliciter différentes voies métaboliques afin de s'épanouir dans des organes distants du pancréas tel que le foie, principal site métastatique. Par ce projet nous proposons un ciblage métabolique de la voie de dégradation de la tyrosine dans le cancer métastatique afin de limiter la généralisation du cancer pancréatique. Cette approche laisse entrevoir de nouvelles perspectives prometteuses pour les patients à un stade avancé et métastatique de la maladie en réduisant l'aspect métastatique et en augmentant leur accès à l'exérèse chirurgicale, seul acte curatif à ce jour. Cette étude reposera sur l'utilisation de différents modèles murins et cellulaires complétée par un traitement avec l'inhibiteur de la voie de la dégradation de la tyrosine, la nitisinone, dont l'utilisation clinique est validée chez des patients présentant des dérégulations de cette voie métabolique. Le premier modèle murin que nous souhaitons utiliser dans ce projet est un modèle métastatique induit dans lequel des souris syngéniques seront injectées avec des cellules cancéreuses pancréatiques métastatiques dont la voie de la tyrosine sera ou non inhibée. Il s'agit d'un protocole de greffes intra-spléniques, modèle métastatique reconnu et publié sur lequel nous reviendrons en détail plus tard dans le document. Le deuxième modèle que

nous souhaitons utiliser est un modèle de greffes intra-hépatiques également reconnu et publié qui sera détaillé ci-dessous. Le dernier modèle sera le modèle murin KIC développant de manière spontanée une tumeur primaire pancréatique et des métastases hépatiques en mimant de façon similaire la progression tumorale observée chez les patients ADKP. Ces souris seront alors mises en régime spécifique (croquettes contenant l'inhibiteur de la voie métabolique de la tyrosine ou croquettes déprivées en Tyrosine et réduites en Phenylalanine, précurseur de la tyrosine. La progression tumorale ainsi que la dissémination métastatique seront les deux éléments clefs analysés. L'utilisation de ces modèles murins est indispensable à cette étude et est soutenue par de nombreux tests *in vitro* déjà réalisés, démontrant l'importance de cette voie métabolique dans la croissance/survie des cellules cancéreuses agressives. Pour ces trois modèles que nous souhaitons mettre en place, le nombre d'animaux par groupe expérimental sera 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 englobant les 3 modèles décrits ci-dessus s'élève à 180 souris. 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 spontanée ou de métastases pancréatiques dans le foie 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), tout cela de manière objective. 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. Pour le modèle de carcinogénèse spontanée (procédures 3 et 4), l'expérience prendra fin lorsque le point limite, tel que défini dans la grille de score sera atteint. Grâce à notre expertise sur ces modèles et aux projets rétrospectifs préalablement développés, nous savons que les souris développent des tumeurs métastatiques entre 9 et 10 semaines, âges auxquels l'expérience prendra fin. Toutes ces actions sont mises en place afin de respecter consciencieusement 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.

17185 Le syndrome de Sanfilippo est la conséquence d'une accumulation de molécules de sulfate d'héparane, partiellement dégradées, dans les tissus de l'organisme (la sulfate d'héparane est un polysaccharide présent dans les tissus animaux). Ceci est le fait d'une mutation génétique qui affecte l'activité d'une enzyme nécessaire pour la dégradation du sulfate d'héparane. Ces molécules mal dégradées, qui ne peuvent pas être éliminées, entravent le développement normal du cerveau puis détruisent les cellules du cerveau. Les premiers symptômes de la maladie associent un retard du développement cognitif associé à une hyperactivité, un comportement autistique et des troubles du sommeil. Ils apparaissent habituellement avant l'âge de 3 ans. Par la suite, l'atteinte neurologique entraîne une déficience intellectuelle et une réduction des capacités motrices qui aboutissent à la perte d'autonomie vers l'âge de 10 ans. Il y a aussi une légère dysmorphie faciale. Actuellement, aucun traitement approuvé ne peut aboutir à la guérison. Les seuls soins apportés visent à traiter les complications liées à la maladie et améliorer la qualité de vie des malades et de leur entourage. Différentes stratégies thérapeutiques ont été testées, telles que la greffe de moelle osseuse ou encore la production d'enzyme recombinante mais leur impact sur l'évolution neurologique est faible. La thérapie génique semble être encourageante pour traiter cette pathologie. Un premier essai clinique par thérapie génique intracérébrale a donné des résultats sont très encourageants chez les patients les plus jeunes. Le traitement est bien toléré et indique un bénéfice dans le développement neurocognitif. Cependant, il est important d'augmenter la quantité d'enzyme apportée et de mieux cibler la périphérie du cerveau. Pour cela, nous proposons de changer de vecteur et d'utiliser un sérotype d'AAV passant la barrière hématoencéphalique. Nous allons donc réaliser une étude préclinique sur le modèle murin que nous avons disponible au laboratoire

et que nous avons déjà utilisé lors de notre précédente étude. Nous avons déjà caractérisé ce modèle, nous pourrions donc comparer nos résultats avec les précédents. Le modèle MPSIIIB-/- est un modèle knock-out mimant bien la pathologie humaine, bien référencé dans la littérature. De nombreux laboratoires l'ont utilisé pour étudier la physiopathologie de ce syndrome ainsi que certaines options thérapeutiques. C'est pourquoi le recours à l'utilisation de souris est indispensable à notre étude. Pour l'ensemble du projet il est prévu d'utiliser au maximum cinq groupes de trente souris qui seront reproduits par trois soit 450 animaux sur 5 ans et d'appliquer la règle des 3R et selon la directive européenne 2010/63/UE comme suit :

Remplacement : Les animaux sont utilisés après des analyses réalisées *in vitro* afin de confirmer des résultats démontrés et des hypothèses formulées à partir des travaux réalisés sur cellules. A ce stade de l'expérimentation, l'utilisation de l'animal est inévitable. Actuellement aucun modèle *in vitro* ne permet de mimer le phénomène étudié dans son ensemble et dans sa complexité. Les études sont systématiquement optimisées (doses AAV, durée) d'après la littérature ou les observations réalisées au laboratoire. De plus, les traitements sont administrés de la façon la moins invasive possible (par priorité : alimentation ou boisson/injection IP/ injection IV).

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, nous utiliserons des groupes de 10 souris par expérience et nous répéterons les expériences 3 fois afin de rendre nos résultats exploitables. Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons autorisés réglementairement seront prélevés sur l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de tissus. 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*.

Raffinement : Le bien-être des animaux sera suivi tout au long de nos expériences et fera l'objet de procédures strictes. Les souris seront toujours hébergées en groupes dans des cages avec une surface réglementaire, avec un libre accès à l'eau et la nourriture. Un suivi des animaux a été mis 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 animaux sont hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et auront à disposition des igloos, des bâtons à ronger et cotons pour la nidification. Les animaux sont suivis quotidiennement, permettant la détection précoce d'anomalies éventuelles. Un animal sera euthanasié s'il présente une prostration continue, une déshydratation ou une perte de poids supérieure à 20%. Des périodes d'acclimations à l'hébergement comme à la manipulation permettront de limiter l'angoisse des animaux. La douleur liée à l'expérimentation sera limitée par l'utilisation systématique d'analgésiques. En outre, 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.

17186 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 dans une majorité de cas la survie est de seulement 6 mois. Surnois et difficilement détecté, dans 80 % des cas 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 urgentement développés afin de limiter/éradiquer ce cancer.

Ce projet est centré sur l'adressage sélectif d'agents d'imagerie isotopique (Tomographie par émission de Positron ou TEP) vers les tumeurs pancréatiques afin d'améliorer le diagnostic de ces tumeurs extrêmement agressives, quasi-incurables. L'imagerie isotopique consiste à injecter une molécule radiomarquée (radiotraceur) au patient qui va s'accrocher spécifiquement dans différentes régions de l'organisme, le patient est ensuite placé sous une caméra capable de détecter la radioactivité qui donne une image 3D de la localisation du radiotraceur dans l'organisme. En fonction du radiotraceur utilisé on peut cibler des régions différentes comme des cellules tumorales, des zones de nécroses ou encore des zones d'inflammations.

L'objectif de cette étude scientifique est de démontrer l'intérêt d'utiliser ce nouvel agent d'imagerie en clinique afin d'améliorer le diagnostic en essayant de discriminer une pancréatite (inflammation du pancréas) d'une tumeur pancréatique sans avoir recours à un acte chirurgical à visée exploratoire.

Cette étude sera réalisée sur des modèles de souris qui reproduisent fidèlement ces pathologies humaines :

1/ modèle de tumeur pancréatique, où des cellules tumorales humaines seront injectées en sous cutanée,

2/ modèles de pancréatite chronique où les souris seront traitées pendant une longue période avec de la céruléine, et l'efficacité du traitement sera vérifiée par échographie et sous anesthésie pour éviter tout stress à l'animal,

3/ double modèle où les souris auront des cellules de tumeur pancréatiques humaines sur le dos et une pancréatite induite ce qui nous permettra de voir si notre agent est capable de discriminer les deux.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle des 3R :

Le REMPLACEMENT : nous avons besoin d'un modèle permettant de reproduire d'un point de vue phénoménologique tout ce qu'implique le développement tumoral et la pancréatite. Un organe isolé ou une espèce autre que les mammifères ne permettront pas d'évaluer la biodistribution du radiotracer expérimental. Nous avons choisi deux modèles simples et exhaustivement décrits dans la littérature chez la souris.

La REDUCTION : Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum requis pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Le nombre total de souris pour cette étude s'élève à 36 souris athymiques. Il tient compte du suivi des trois modèles expérimentaux développés dans le projet et de la variabilité de développement des tumeurs qu'il peut exister dans ces modèles.

Le RAFFINEMENT : 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 atteints de pancréatite 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, sera atteint, l'expérience prendra fin. A la fin du projet tous les animaux seront mis à mort.

17187 Notre projet concerne la description des effets de l'exposition au cannabis sur l'organisation fonctionnelle des réseaux Hippocampe-Amygdale et Hippocampe-Striatum ventral chez le rat adulte des deux sexes.

Le cannabis est la drogue illégale la plus consommée dans le monde. La banalisation croissante du produit chez les adolescents et les jeunes adultes est un enjeu majeur de santé publique. En effet la consommation précoce pendant l'adolescence augmente significativement les risques de troubles neuropsychiatriques. Le cannabis est très largement consommé par les femmes, pourtant peu d'études s'intéressent aux effets du cannabis dans les deux sexes.

Notre laboratoire a une longue expérience de l'étude des drogues toxicomanogènes et particulièrement le cannabis sur les synapses du système nerveux central. Nous voulons maintenant modéliser l'exposition au cannabis durant l'adolescence et en étudier les effets chez des rats adultes, au niveau de synapses identifiées par optogénétique et électrophysiologie ex-vivo puis immuno-histochimie et qPCR.

Globalement, les résultats de notre étude nous permettront d'identifier des réseaux neuronaux perturbés par l'exposition au cannabis durant une phase critique du développement post-natal, l'adolescence.

Ce projet utilisera des rats Wistars car ceux-ci présentent une organisation des réseaux cortico-striataux proches de ceux décrits chez l'homme. Un total de 160 animaux seront utilisés.

Les modèles rats qui modélisent de manière fidèle les pathologies neuropsychiatriques sont couramment utilisés en neuroscience rendant nos résultats pertinents pour une large communauté scientifique et nous pourrions capitaliser sur nos résultats déjà publiés et diminuer le nombre d'animaux utilisés. L'organisation des réseaux cortico-striataux change en fonction du stade développemental, de

l'activité d'autres régions sous-corticales, de l'expérience de chaque individu et de l'influence de l'environnement. De fait, les modèles rats ne peuvent pas être (R) remplacés par des modèles de cultures cellulaires *in vitro*. Réduction (R) et Raffinement (R): Ce projet est conçu pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, chaque rat sert à plusieurs mesures électrophysiologiques et/ou biochimiques et/ou anatomiques.

Douleur: Les animaux sont anesthésiés par Xylazine/Ketamine pour toutes les procédures chirurgicales. Ils reçoivent également des analgésiques locaux.

Souffrance et angoisse: Les manipulations par l'expérimentateur sont limitées afin de diminuer le stress. Les animaux sont anesthésiés lorsqu'une manipulation est stressante. Le bien-être des animaux est évalué quotidiennement : prise du poids et observation de leur aspect et comportement.

Tous les animaux bénéficient d'enrichissement pour diminuer l'ennui, l'anxiété et favoriser le bien être (Rats: Bûchettes en peuplier; Litière absorbante enrichie; Tunnels en carton).

Étude statistique: Les tests statistiques utilisés sont non-paramétriques, adaptés aux petits échantillons (Mann-Whitney). Nous avons établi que des groupes entre 10-30 animaux (pour l'*ex vivo* électrophysiologie/biochimie) sont nécessaires pour atteindre une différence significative ($p < 0.05$) avec une puissance de 80 % dans des tests non paramétriques (Mann-Whitney). L'effet minimum observé varie selon les mesures de 15 à 70%.

Sur une période de 5 ans, nous utiliserons 80 rats de chaque sexe, soit 160 rats.

17188 Les troubles psychiatriques sont considérés comme le principal défi sanitaire du 21^e siècle, en raison de leur prévalence élevée, 38 % de la population en Europe, et de l'énorme handicap qui y est associé. Les troubles dépressifs caractérisés (TDC) sont les plus fréquents, avec une prévalence de 16 % au cours de la vie. Ces troubles chroniques récidivants ont des conséquences psychosociales majeures et des coûts considérables pour la communauté. Les projections indiquent que les TDC seront le second contributeur aux coûts de prise en charge en 2020, avant d'occuper la 1^{ère} place en 2030. Actuellement, plus de deux tiers des patients traités par un antidépresseur prescrit en 1^{ère} intention ne présentent pas de rémission. De plus, 20 à 30% des patients résistent à l'ensemble des stratégies médicamenteuses.

Décrit comme « un organe additionnel » et composé de plus de 1000 espèces bactériennes différentes répertoriées, le microbiote intestinal peut également jouer un rôle bénéfique dans de nombreuses fonctions biologiques et notamment dans la régulation du système nerveux.

De ce fait, le but de cette étude est d'évaluer le potentiel de composés stimulant le microbiote intestinal sur les troubles de types anxiodépressifs.

Pour ce faire, une partie des animaux seront soumis à un protocole de stress de chronique afin d'induire des troubles de types anxiodépressifs chez la souris et seront comparés à des animaux non stressés. A la fin de cette procédure des tests comportementaux seront réalisés afin de valider la mise en place des troubles chez les animaux stressés. Par la suite, des traitements pharmacologiques chroniques ciblant le microbiote intestinal seront mis en place durant 21 jours consécutifs. A la fin des traitements de nouveaux tests comportementaux ciblant les troubles anxiodépressifs seront réalisés afin d'étudier si les traitements pharmacologiques ont permis de diminuer voir de supprimer les troubles neuro-psychiatriques étudiés. Pour cela, notre projet requiert l'utilisation de 144 souris.

L'ensemble de ce projet s'effectuera en adéquation avec la règle des 3R visant à remplacer lorsque cela est possible, raffiner et réduire l'utilisation des animaux.

- Remplacement : Cette étude ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. En effet, l'étude comportementale des troubles de type anxio-dépressifs dans leur globalité nécessite d'étudier des organismes vivant entiers (dans notre cas un modèle murin) du fait de la complexité des interactions entre les différentes structures cérébrales impliquées et l'environnement dans lequel évoluent les animaux.

- Raffinement : Les souris sont hébergées dans une pièce cyclée (cycle jour/nuit 12h/12h) thermorégulée et ont un libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson. De plus, la fréquentation de la pièce d'hébergement des animaux est strictement réglementée afin de réduire au maximum le stress

et l'inconfort lié à une trop grande fréquentation du lieu d'hébergement. Par ailleurs, les animaux seront surveillés quotidiennement et disposeront au sein de leur cage d'hébergement d'un milieu enrichi leur permettant la fabrication de nids.

- Réduction : Le nombre de 144 souris utilisées pour ce projet (12 groupes de 12 souris) correspond au nombre minimum d'animaux permettant de garantir une solidité et une interprétation fiable des résultats obtenus en ce qui concerne les expérimentations comportementales et pharmacologiques.

17189 Ce projet de recherches en neurosciences vise à étudier le fonctionnement du cortex cérébral, cette structure située à la surface de notre cerveau, communément appelée "matière grise", et bien connue pour son implication dans les fonctions cognitives, depuis l'analyse sensorielle jusqu'à la genèse de commandes motrices. L'objectif de notre projet est tout d'abord d'étudier l'implication de cette structure dans l'intégration d'informations sensorielles tactiles, mais aussi de comprendre comment ces informations sont intégrées dans le cadre de la production de commandes motrices pour optimiser le comportement. Ces recherches visent à approfondir les connaissances sur le fonctionnement de notre cerveau et les bases neuronales du comportement. Elles sont également indispensables pour avancer dans la voie du développement de neuroprothèses contrôlables par interface cerveau-machine.

La réalisation de notre projet implique de mesurer et contrôler l'activité neuronale avec une résolution spatiotemporelle qu'il est impossible d'atteindre avec des méthodes non invasives chez l'homme. Nous souhaitons donc interroger le cerveau de modèles murins à travers plusieurs stratégies complémentaires. D'une part, nous mesurerons l'activité somatosensorielle corticale des souris à plusieurs échelles, depuis le neurone unique à l'aide de microélectrodes, jusqu'à l'échelle mésoscopique du réseau de neurones à l'aide d'imagerie sensible au potentiel et d'imagerie calcique. D'autre part, nous étudierons les souris dans plusieurs conditions différentes : imagerie et électrophysiologie chez des souris anesthésiées, éveillées, en comportement, et enfin dans le cadre d'une exploration en boucle fermée impliquant une interface cerveau-machine.

Le choix de la souris comme modèle est effectué dans le but d'avoir accès aux outils optogénétiques, électrophysiologiques et de comportement opérant. Cela nous permettra de réaliser des protocoles expérimentaux impossibles avec d'autres espèces, et de répondre pleinement à nos questions scientifiques en minimisant le nombre d'animaux nécessaires.

Pour réduire le nombre d'animaux impliqués dans ces expériences, nous utiliserons le plus possible des préparations chroniques qui maximisent la quantité d'information acquise pour chaque souris.

Ainsi, pour mener à bien l'ensemble des expériences envisagées pendant les 5 prochaines années, notre équipe de 10 chercheurs nécessitera au maximum 2100 souris, y compris des souris transgéniques exprimant dans certains neurones du système nerveux différentes opsines et rapporteurs de l'activité neuronale. L'utilisation de ces souris transgéniques déjà existantes permet notamment d'éviter certaines opérations invasives (par exemple, injections de vecteurs viraux), ce qui contribue à minimiser la souffrance animale et ainsi aide au bien-être des animaux.

17190 Le mélanome uvéal est une pathologie très agressive. Le traitement du mélanome uvéal utilise la chirurgie, la radiothérapie (protonthérapie), et dans les cas les plus invasifs, l'énucléation (ablation de l'œil).

En dépit de l'efficacité des traitements de la maladie locale, environ 50% des patients développera des métastases hépatiques. Actuellement, aucun traitement ne prévient l'apparition ou ne traite les métastases. La maladie métastatique est létale dans 100% des cas au bout d'environ un an.

Dans ce projet, nous développerons un modèle murin de mélanome uvéal dans lequel nous testerons un nouveau traitement.

Nos études permettront de confirmer qu'un inhibiteur pharmacologique des récepteurs CXCR1/2 réduit la croissance tumorale et empêche le développement de métastases hépatiques.

La finalité de ce projet consiste à augmenter la survie des patients tout en améliorant leur qualité de vie.

Cette étude sera réalisée sur des souris, un modèle classique et admis pour l'étude de nouveaux traitements en cancérologie.

Le modèle que nous avons sélectionné consiste en l'injection de type de cellules tumorales humaines de mélanome uvéal (cellules issues de la tumeur primitive et cellules issues d'une métastase) dans des souris immunodéficientes (NOD-SCID). L'ensemble de cette étude sera réalisé sur 80 animaux et dans le respect de l'éthique et du bien-être animal.

Réduction: Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, des études *in vitro* ont été réalisées. Nous avons démontré que notre inhibiteur de CXCR1/2 est efficace dans des modèles précliniques (souris) de cancer du rein et cancer de la tête et du cou. Avant de passer au modèle *in vivo*, toutes nos expériences ont été préalablement validées *in vitro* (cellules de mélanome uvéal).

Remplacement: Il n'existe pas de méthodes alternatives ni substitutives à l'utilisation de souris pour nos objectifs. Cette étude nous permettra de réaliser une première étude préclinique validant la pertinence de l'utilisation de notre inhibiteur pour le traitement du mélanome uvéal primaire et métastatique.

Raffinement: Les animaux âgés de 6 à 8 semaines seront mis dans des cages enrichies (maison et morceaux de papiers) sur portoirs (5 animaux/cage), nourriture et boisson ad libitum. De plus, les expériences seront menées de sorte qu'aucune souris ne reste isolée. Les expérimentateurs procéderont à une évaluation quotidienne de l'état général des souris pour déterminer la présence de signes de stress ou de souffrance (attitude soumise, dos voûté, respiration difficile, extrémités pâles, démarche anormale, diarrhée). En cas de stress ou de souffrance important et/ou persistant, les animaux seront systématiquement euthanasiés.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous nous baserons sur les données de la littérature et sur nos résultats antérieurs pour les doses administrées de composé pharmacologique.

17191 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 dans une plateforme d'immunothérapie novatrice. Disposant de résultats préliminaires prometteurs quant à l'efficacité de notre formulation sur la survie des animaux dans un modèle de mélanome cutané, nous souhaitons maintenant étudier la mécanistique de la réponse immunitaire induite par notre plateforme d'immunothérapies.

Afin d'étudier la réponse immunitaire provoquant l'effet antitumoral de notre traitement, nous traiterons avec les différents composants de notre formulation (inhibiteur de point de contrôle et néoantigène) par différentes voies d'injection (sous-cutanée ou intra-péritonéales) des souris porteuses de tumeurs cutanées (mélanome).

Par la suite, sur le même modèle murin de mélanome, nous étudierons les mécanismes sous-tendant l'effet synergique de notre formulation et du traitement inhibiteur de point de contrôle.

Dans un second axe, nous souhaitons étudier les cascades cellulaires et moléculaires mises en œuvre dans la sensibilisation aux néoantigènes que nous ciblons. Pour cela, nous réaliserons des injections de notre formulation à des souris saines et prélèverons les ganglions drainants, la rate, le site d'injection et le sang afin d'analyser les réseaux impliqués par des techniques immunologiques et de biologie moléculaire et cellulaire.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 1600 souris sur 5 ans.

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 8 à 9 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 : L'inoculation des cellules tumorales sera réalisée sous anesthésie générale gazeuse légère. 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 d'un vétérinaire. Les animaux seront maintenus en groupe dans des cages enrichies de matériel physique pour les besoins comportementaux de base (matériel de nidation et bâtons à ronger).

17192 L'objectif du projet est le développement de produits de santé chez les poissons d'élevage. La mise en place de modèles reproduisant les pathologies terrain chez le poisson d'élevage est une condition préalable au développement de produits de santé dans ce secteur. Notre société a pour but de proposer des modèles pour les maladies les plus courantes des poissons d'élevage suivants : Barramundi (*Lates calcarifer*), Carpe (*Cyprinus carpio*), Poisson chat (*Pangasius hypophthalmus*), Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Truite (*Oncorhynchus mykiss*),. Aujourd'hui en France, aucun modèle existe pour les principales maladies des espèces de poissons élevés dans les eaux dites « chaudes ».

Les produits de santé testés dans nos laboratoires seront des produits de prévention de type vaccin ou additif alimentaire comme solutions durables. Les modalités d'application de ces produits sont la voie orale, l'immersion ou l'injection intra-péritonéale. Le développement de produits de santé en aquaculture nécessite les étapes suivantes : développement et confirmation du modèle dans le lot d'étude, application de prototypes, évaluation d'efficacité, évaluation de sûreté, évaluation de la durée d'action etc...). Nous estimons qu'un maximum de 30 000 animaux par an soit 150 000 pour toute la durée du projet seront utilisés pour le développement des produits de la santé dans notre établissement (capacité maximale de notre établissement). Le nombre d'animaux utilisés dans les essais pour le développement d'un produit est insignifiant par rapport au nombre de poissons pouvant être « sauvés » avec les produits développés. Ceci avec un impact social et économique en sus.

Selon les projections de la FAO (Food and Agriculture Organisation) , on estime que pour maintenir le niveau actuel de la consommation par habitant, la production mondiale de l'aquaculture devra atteindre 80 millions de tonnes d'ici 2050. Afin de réaliser ce défi il est capital de s'intéresser aux solutions de santé afin d'aider le développement économique et social dans de nombreux pays et d'assurer le niveau de consommation actuel.

Nous nous sommes équipés pour pouvoir travailler directement dans l'espèce cible avec des modèles robustes et standardisés, ce qui diminue au maximum le nombre d'animaux utilisés dans le développement de produits. Nous sommes conscients que nous avons besoin d'utiliser le modèle animal afin de développer des produits pertinents, sûrs et efficaces (scientifiquement et réglementairement). Nous sommes donc convaincus que les dommages sont certes nécessaires mais que les avantages escomptés l'emportent sur les préjudices causés aux animaux.

Afin de respecter les 3 « R » (Remplacement, Réduction, Raffinement), nous utilisons les stratégies suivantes :

- Utilisation de groupes d'animaux les plus homogène possibles
- Utilisation des statistiques pour évaluer le nombre d'animaux pertinent avant le début des expériences
- Des essais dans l'espèce cible, animaux les plus sensibles, directement nous permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour le développement des produits
- Rédaction d'un protocole d'étude pour chaque essai effectué ainsi qu'un rapport d'étude afin d'optimiser l'interprétation des données et éviter la répétition inutile d'essais.

- Assurer une qualité d'eau la plus constante possible afin de stabiliser l'environnement et diminuer la variabilité donc diminuer le nombre d'animaux nécessaires
- Une analyse systématique des données zootechnique de l'élevage afin de pouvoir apporter des améliorations continues
- Respecter les groupes sociaux (les animaux ne sont jamais isolés) et d'espèce (aucun mélange d'espèce différents)
- Du personnel compétant et formé spécifiquement à notre activité permet un suivi optimal des animaux

17193 L'exercice excentrique permettrait de développer un meilleur rapport force musculaire / coût énergétique que l'exercice concentrique. Cette modalité d'exercice est de choix pour les patients présentant une diminution de la fonction musculaire observée dans les pathologies chroniques et / ou le vieillissement. Le vieillissement musculaire aussi appelée sarcopénie est aggravé par une carence en nutriments, telle que la vitamine D ou par la résistance aux protéines anaboliques.

L'objectif du projet est de tester l'effet d'un entraînement à dominante excentrique versus concentrique en association avec un régime nutritionnel standard ou enrichi en vitamine D (VitD) et protéines de lactosérum pour limiter l'altération la fonction musculaire due à l'âge.

À cette fin, nous utiliserons 72 souris âgées de 60 semaines (C57BL6) déplétées 1 mois en vitamine D. Ces 72 souris seront réparties en 6 groupes de 12 :

Gr CTL : régime standard, pas d'exercices imposés

Gr CX : régime standard, entraînement concentrique

Gr EX : régime standard, entraînement excentrique

Gr D-PROT-CTL : régime enrichi en vitD + protéines, pas d'exercices imposés

Gr D-PROT-CX : régime enrichi en vitD + protéines, entraînement concentrique

Gr D-PROT-EX : régime enrichi en vitD + protéines, entraînement excentrique

Les protocoles d'entraînement sur dérouleront sur un tapis roulant qui dans le cas des groupes en entraînement excentrique sera incliné pour simuler la course en descente ce qui sollicite des contractions excentriques du triceps brachialis et du vastus medialis.

Nous évaluerons de manière longitudinale le développement de la force musculaire à l'aide du test d'agrippement, la coordination motrice à l'aide d'un analyseur de marche et les capacités physiques par des tests de VMA sur tapis et mesure de la VO2 max. La mesure de la composition corporelle sera effectuée par EchoMRI et la dépense énergétique dans une chambre calorimétrique.

Des dosages par microtechniques (prélèvement dans la veine de la queue) permettront de mesurer, les taux de glucose, triglycérides, HDL et LDL cholestérol, de lactate et l'activité de la créatine kinase (reflet des lésions musculaires).

Après sacrifice, la fonction mitochondriale, la consommation de substrat énergétique et la synthèse des protéines seront respectivement évaluées au niveau musculaire par oxygraphie et la méthode du traceur après injection d'isotopes stables. Le typage des fibres musculaires sera réalisé par immunohistologie.

L'ensemble du projet comporte 13 procédures dont le degré de gravité est léger. Un maximum de mesures seront prises afin de respecter la règle des 3R (raffiner, réduire et remplacer). Ainsi le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum tout en permettant d'effectuer des statistiques fiables avec une puissance suffisante. Des points limites précis sont proposés pour réduire la souffrance des animaux s'il y a lieu. Les paramètres mesurés (locomotion, force...) et les protocoles d'activité physique détaillés dans ce projet ne permettent pas l'utilisation d'un modèle cellulaire.

17194 Au cours des trois dernières décennies, la pharmacocinétique s'est imposée comme un domaine clé pour comprendre et prédire l'efficacité anticancéreuse des médicaments en recherche préclinique. Les grandes firmes pharmaceutiques internationales investissent largement depuis les années 1990 dans des projets de développement d'études pharmacocinétiques en créant notamment des services qui y sont entièrement dédiés. Certains auteurs ont d'ailleurs pu mettre en évidence que 40% des échecs

de développement d'un médicament en phase clinique étaient dus à un manque de prédictions pharmacocinétiques lors des études précliniques en 1991, alors que ce taux d'échec était abaissé à 10% en 2000.

Depuis les années 1980, les nanomédicaments sont considérés comme des outils très prometteurs dans l'imagerie, le diagnostic et le traitement du cancer, à travers notamment un ciblage de la tumeur et/ou de son microenvironnement. Cependant, malgré des résultats très encourageants lors des études précliniques *in vitro* et *in vivo*, de très nombreux échecs sont observés au cours des phases cliniques. Pour expliquer ces échecs, les études pharmacocinétiques des nanomédicaments et plus précisément de biodistribution sont principalement pointées du doigt.

En effet, la détection dans le sang ou les organes des nanomédicaments est principalement réalisée à l'aide de trois techniques indirectes : le dosage d'un principe actif encapsulé, la mesure de la fluorescence d'un fluorophore encapsulé et la radioactivité d'un radioélément encapsulé. Cependant, ces techniques ne permettent pas de confirmer l'intégrité des nanomédicaments lors de leur détection. Rien ne permet, avec ces techniques, d'affirmer qu'après administration à un animal, le principe actif, fluorophore ou atome radioactif font toujours parti du nanosystème formulé. Ce biais de mesure pourrait expliquer, au moins en partie, les échecs des nanomédicaments à visée anti-cancéreuse en phases cliniques.

Le système Förster Resonance Energy Transfer (FRET) mettant à profit la proximité de deux fluorophores (entre 2 et 10nm), un donneur, dont l'onde d'émission correspond à la longueur d'onde d'excitation d'un accepteur, est la seule technique d'imagerie par fluorescence à ce jour décrite permettant de détecter et donc de suivre les nanomédicaments sous leur forme intègre. La nanoencapsulation d'un tel système permet d'affirmer avec certitude la présence des nanomédicaments dans les fluides biologiques tels que le sang, mais également dans les tissus et les différents organes. La détection de nanocapsules par signal FRET a été récemment mise au point. Cependant, la détection des nanomédicaments par signal FRET reste qualitative chez l'animal. Récemment, des travaux ont permis de développer, *in vitro*, une détection quantitative lorsque le signal FRET était associé au nanoparticle tracking analysis (NTA).

Le présent projet de recherche propose d'exploiter cette méthode de détection quantitative de nanoparticules (FRET associé au NTA) mise au point *in vitro* pour étudier la biodistribution de différentes nanocapsules lipidiques (NCL) après administration IV chez le rat. Il sera alors possible de distinguer l'affinité de certaines formulations pour les différents organes.

Le présent projet consiste à i) mettre au point une méthode d'extraction des NCL à partir du sang et des organes, ii) évaluer le profil pharmacocinétique de NCL de taille et de charge différentes et iii) évaluer la biodistribution de ces NCL chez le rat.

De façon générale, des rats mâles âgés entre 8 et 12 semaines pesant plus de 250 g seront utilisés. L'injection de 1013 particules / 100 g de rat sera réalisé en intraveineux dans la veine péniennne du rat anesthésié sous isoflurane. Des échantillons de 100µl de sang seront prélevés dans la veine caudale (gauche et droite alternativement) du rat anesthésié sous isoflurane aux temps suivants (T en minute et H en heure) : T5, T30, T60, T120, T180, T240, T360 et H24. Le volume total de sang prélevé sur 24h pour chaque rat s'élève à 800 µl, ce qui est inférieur à 7,5% de la volémie d'un rat adulte.

La mise au point de la méthode d'extraction sera réalisée de la façon suivante : une heure après l'injection, le rat sera sacrifié par inhalation de CO₂ et le sang ainsi que les organes suivants seront prélevés : foie, intestin, pancréas, rate, poumons, cerveau, prostate. Les NCL seront extraites du sang et des organes après broyage et ultracentrifugation en gradient de Ficoll®.

Le profil pharmacocinétique sera étudié après extraction des NCL des différents prélèvements sanguins puis quantification du signal FRET.

La biodistribution des NCL sera étudiée après extraction des NCL et quantification du signal FRET dans les organes suivants : foie, intestin, pancréas, rate, poumons, cerveau, prostate.

Le nombre maximum d'animaux pour ce projet s'élève à 552.

Parce que les études de pharmacocinétique requièrent l'utilisation d'animaux, leur remplacement est impossible. Le rat a été choisi en raison de sa volémie plus importante que celle de la souris permettant

ainsi des prélèvements de 100 µl et un volume prélevé sur 24 h de 800 µl, ce qui sera inférieur à 7,5% de leur volémie. Tout est mis en œuvre dans ce projet pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires (maximum n=6 pour chaque condition). Par ailleurs, le principe de raffinement sera appliqué en hébergeant les animaux en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi, avec une surveillance quotidienne. Enfin, les points d'injection et de prélèvement seront suivis tout au long de l'expérience. En cas de constat d'ulcération, de nécrose ou d'infection, le rat sera retiré du protocole et euthanasié par inhalation de CO₂.

17195 Le statut sanitaire des colonies de souris de laboratoire utilisées comme modèles animaux pour les recherches scientifiques et biomédicales conditionne à la fois leur état de santé, leur bien-être, et leur pertinence en tant que modèle.

L'évolution des connaissances concernant les pathogènes spécifiques des rongeurs, et des contaminations accidentelles, imposent un nouveau programme de décontamination par transfert d'embryons de l'ensemble des modèles génétiques murins utilisés dans un centre de recherche biomédicale pour mieux comprendre des maladies génétiques et des pathologies tumorales chez l'homme, et pour évaluer des approches thérapeutiques répondant à ces maladies.

Le projet consiste à permettre de décontaminer une partie des modèles murins originaux présents dans le centre de recherche pour les transférer vers un autre centre indemne des agents microbiologiques présents qui pourraient interférer avec leur utilisation comme modèle animal. Le transfert d'embryons avant implantation chez des femelles receveuses indemnes de contaminants permet d'obtenir des animaux assainis pour chacune des lignées.

Ce transfert d'embryons implique des procédures de stimulation hormonale des femelles donneuses par injection pour la production des embryons. Des femelles pseudo-gestantes, obtenues par accouplement avec des males stériles vasectomisés sont utilisées dans l'établissement destinataire comme receveuses. Le transfert d'embryons est réalisé dans l'établissement destinataire après une procédure de décontamination des embryons par lavages successifs.

Le remplacement concerne les phases de décontamination proprement dites des embryons, réalisées ex-vivo par lavage, l'objectif étant l'amélioration de l'utilisation de modèles génétiques pré-existants.

Le raffinement des procédures inclura un protocole de stimulation hormonale optimisé, la surveillance rapprochée des animaux après stimulation, l'utilisation de points limites systématiques précoces.

La réduction du nombre d'animaux conduira à la réalisation d'une partie seulement des transferts prévus si la transmission des génotypes d'intérêt est obtenue plus rapidement.

Un total de 100 modèles génétiques murins originaux d'intérêt sera redérivé dans des conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) pour l'utilisation d'un nombre maximum de 800 souris adultes.

17196 Contexte : La vaccination joue un rôle important pour le bien-être animal et pour la santé publique. De nombreux vaccins ont été développés et sont utilisés pour la prévention des maladies aviaires. Des programmes vaccinaux très divers, adaptés aux différents contextes environnementaux et épidémiologiques, sont mis en place dans les élevages avicoles. Pour faire face au nombre croissant d'animaux à vacciner dans les élevages, depuis près de 30 ans, des solutions techniques ont été mises au point afin de garantir une vaccination plus rapide et efficace, en essayant de limiter le facteur humain et en garantissant un confort pour les animaux.

Aujourd'hui, la totalité des poulets en France et au niveau mondial, sont vaccinés à l'aide de matériel médical adapté aux vaccins, vivants ou atténués, et au type de production. Une vaste gamme d'équipements de vaccination a été développée et mise à la disposition des éleveurs : injecteurs pour la vaccination in-ovo, nébuliseurs pour vacciner les animaux par aérosol, injecteurs pour l'injection sous-cutanée, etc.

La généralisation de l'utilisation de ces équipements a permis une meilleure maîtrise de la vaccination en élevage. Un bénéfice lié à l'utilisation de ces équipements s'évalue en termes de diminution des coûts de vaccination, de l'amélioration de la protection vaccinale des animaux et aussi d'une meilleure gestion du stress des animaux en réduisant au minimum la manipulation humaine. Même si les

bénéfices de l'utilisation de ces équipements sont largement reconnus, il persiste néanmoins des zones d'ombre quant à leurs conditions d'utilisation dans les conditions du terrain et l'utilisation de ce matériel n'est soumis à aucune réglementation spécifique. Le bon fonctionnement de ces équipements est fondamental afin d'assurer la qualité d'administration des vaccins et d'optimiser leur impact sur le bien-être des animaux.

Objectif: L'objectif de ce projet est de valider l'utilisation de ces équipements de vaccination communément utilisés dans les élevages avicoles en évaluant la qualité de la prise vaccinale.

Avantages et dommages :

Les dommages induits par les procédures peuvent être de l'inconfort, du stress et une gêne liée aux administrations du vaccin et aux prélèvements répétés.

Informations sur les espèces utilisées:

Les études de ce projet seront réalisées sur l'espèce poulets, jusqu'à 5000 poulets seront utilisés sur une période de 5 ans. Cela nous permettra de valider sur des bases scientifiques une large gamme de matériels médicaux utilisés pour l'administration des vaccins en aviculture et de pouvoir ensuite optimiser leur utilisation dans les élevages.

Mise en œuvre des 3Rs

Remplacement : Seules les études *in vivo* permettent de confirmer l'activité du vaccin et c'est important de tester le vaccin dans des conditions qui se rapprochent des conditions réelles d'utilisation.

Réduction : Les effectifs des animaux sont calculés au plus juste afin d'utiliser le nombre minimal pour garantir l'atteinte de l'objectif du projet.

Raffinement : aucune douleur n'est attendue dans ce projet, néanmoins des points limites spécifiques à l'espèce poulet et un suivi adapté sont mis en place afin de prendre en charge les animaux le plus rapidement et efficacement possible lors d'éventuelles réactions secondaires liées à l'injection du vaccin ou liées à des maladies naturelles. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour garantir leur confort et leur bien-être. Les animaux ont à disposition des méthodes d'enrichissement afin de stimuler l'exercice physique et leurs activités cognitives : litière en copeaux de bois, plaquette d'œuf en carton, bac à sable et perchoirs.

17197 Les anomalies génétiques de la substance blanche du cerveau chez l'homme, également appelées leucodystrophies, entraînent des handicaps allant de légers à très sévères. Les patients sont le plus souvent des enfants qui meurent prématurément faute d'un traitement efficace. Toutes les leucodystrophies partagent plusieurs traits pathologiques dont les plus importants se caractérisent par des atteintes de la substance blanche et de la myéline, une substance riche en lipide produite par les oligodendrocytes et essentielle pour la conduction de l'influx nerveux. Bien que plusieurs mutations aient déjà été identifiées, notre compréhension de la cascade des mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant du défaut génétique à l'handicap est encore très limitée. Le but de ce projet est d'établir comment les précurseurs d'oligodendrocytes dérivés des cellules souches pluripotentes induites, en provenance de patients présentant des leucodystrophies, se comportent dans le cerveau, c'est à dire dans un environnement naturel où les interactions cellulaires restent intactes. Une fois différenciées en précurseurs d'oligodendrocytes, ces cellules humaines seront injectées dans le cerveau de souris pour étudier leur capacité à proliférer, à se différencier et à myéliniser les axones de la substance blanche dans un environnement complexe *in vivo*. Cela nous permettra d'établir l'influence de l'environnement physiologique sur la fonction de ces cellules et de tester si des stimulations neuronales *in vivo* améliorent leur fonctionnement. Pour atteindre ces objectifs, le projet associe l'expertise (i) d'équipes de recherche européennes reconnues, travaillant dans le domaine de la substance blanche et des maladies de la myéline et (ii) l'association européenne des patients atteints de leucodystrophies. Ce projet pourrait accélérer nos connaissances sur les mécanismes de ces maladies.

Nos protocoles ne peuvent malheureusement pas être remplacés par des procédures *in vitro* car il s'agit de reproduire l'environnement naturel et complexe des cellules pour étudier les conséquences au niveau des réseaux de neurones et du comportement de l'animal. Un total de 360 souris

transgéniques sur trois années sera utilisé pour des expériences d'optogénétique et d'immunohistochimie. Le calcul du nombre d'animaux a été fait afin d'obtenir un nombre suffisant de données pour chaque protocole expérimental, tout en appliquant strictement les grands principes éthiques de l'expérimentation animale. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures de chirurgie du cerveau se dérouleront sous anesthésie. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. Notre compréhension des mécanismes impliqués dans les leucodystrophies sera toujours insuffisante s'ils ne sont pas induits et analysés dans leur milieu naturel complexe, c'est à dire l'animal entier et vivant. En étudiant les différentes composantes de façon isolée, de nombreux effets émergents de l'activité neuronale et des interactions cellulaires seront obligatoirement négligés. L'utilisation de l'animal est donc primordiale pour obtenir des résultats qui puissent avoir un véritable impact dans le développement de nouvelles thérapies chez l'homme. En particulier, la souris présente un système nerveux suffisamment développé pour permettre une extrapolation des résultats à l'espèce humaine. Une autre raison pour utiliser la souris est la possibilité de manipuler des types précis de cellules chez des animaux transgéniques. Cette étude est importante pour comprendre l'impact des anomalies de la myéline sur le fonctionnement des réseaux neuronaux en lien avec des leucodystrophies. Nous travaillerons principalement sur le corps calleux car il est une structure centrale de la substance blanche du système nerveux central qui relie les deux hémisphères cérébraux. Nous espérons que les résultats de notre projet ouvriront la voie au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces maladies.

17198 Le système immunitaire est l'ensemble des éléments du corps (barrières physiques/chimiques et cellules immunitaires spécialisées) qui surveille et détruit les cellules anormales. Malheureusement les cellules cancéreuses arrivent souvent à passer outre le système immunitaire. L'immunothérapie a été développée ces dernières années avec pour objectif de réactiver le système immunitaire contre les tumeurs et de très bons résultats cliniques ont été rapportés.

L'une des principales modalités de traitement dans l'immunothérapie du cancer a été la thérapie cellulaire adoptive ie l'utilisation thérapeutique de cellules immunes propres du patient. En utilisant cette approche, des lymphocytes T qui reconnaissent spécifiquement la tumeur sont ainsi perfusés chez des patients cancéreux dans le but de reconnaître, de cibler et de détruire des cellules tumorales. L'immunothérapie cellulaire a montré récemment des résultats extrêmement prometteurs en utilisant des cellules modifiées, en particulier des cellules T portant un récepteur d'antigène chimérique (CAR-T), particulièrement dans le cas des cancers hématologiques (certains lymphomes et leucémies), mais des résultats moins encourageants ont été observés dans le cas des tumeurs solides. Ces CAR-T expriment une molécule à leur surface qui les rend particulièrement efficaces dans l'identification et l'élimination des cellules cancéreuses

Dans ce projet, nous allons génétiquement modifier les lymphocytes T afin de les rendre plus efficaces contre les tumeurs solides.

Remplacement : 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. En effet les expériences *in vivo* permettent d'évaluer la circulation des cellules modifiées jusqu'à la tumeur, ainsi que leur persistance et les interactions avec les autres cellules présentes chez l'animal. Par conséquent, les réponses anti-tumorales seront analysées chez des souris avec des tumeurs humaines et traitées avec des cellules modifiées artificiellement en laboratoire.

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.

Réduction : Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaires faisant l'objet de la présente demande sera de 5200 souris. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés (taille des groupes expérimentaux, approche par étape afin d définir le meilleur modèle d'étude), tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus.

Raffinement : En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être, le recours à une analgésie appropriée permettra une prévention adéquate de la douleur, et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux selon des points limites listés dans la grille de score jointes.

17199 La myéline est une substance riche en lipide qui est produite par les oligodendrocytes au niveau du système nerveux central. Elle sert à isoler et à protéger les fibres nerveuses ainsi qu'à permettre la conduction rapide de l'influx nerveux. Le processus de myélinisation au cours du développement postnatal est essentiel à la mise en place de la synchronisation des réseaux neuronaux. Bien que la myéline ait un impact sur le comportement et la cognition, l'effet de ses anomalies au cours du développement tardif est peu connu. Notre hypothèse est que la myélinisation au cours du développement tardif (adolescence et jeunes adultes) est un élément clé pour établir l'exécution de tâches complexes comme le conditionnement à la peur ou le contrôle cognitif, et que certaines maladies psychiatriques comme la schizophrénie sont en partie provoquées par une myélinisation anormale.

Dans ce projet, nous évaluerons comment les anomalies de la myéline affectent le neuro-développement normal du cortex cérébral, en particulier du cortex préfrontal, engendrant une activité neuronale et des comportements anormaux caractéristiques des maladies psychiatriques comme la schizophrénie. Pour ce faire, nous utiliserons des modèles murins présentant différents types de défauts de myélinisation. Nos protocoles ne peuvent malheureusement pas être remplacés par des procédures *in vitro* car il s'agit de reproduire l'environnement naturel et complexe des cellules pour étudier les conséquences aux niveaux des réseaux de neurones et du comportement de l'animal.

Notre compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies psychiatriques sera toujours insuffisante s'ils ne sont pas induits et analysés dans leur milieu naturel complexe, c'est à dire l'animal entier et vivant. En étudiant les différentes composantes de façon isolée, de nombreux effets émergents de l'activité neuronale et des interactions cellulaires seront obligatoirement négligés. L'utilisation de l'animal est donc primordiale pour obtenir des résultats qui puissent avoir un véritable impact dans le développement de nouvelles thérapies chez l'homme. Or la souris présente un système nerveux suffisamment développé pour permettre une extrapolation des résultats à l'espèce humaine.

Un total de 2480 souris transgéniques sur cinq années sera utilisé pour des expériences d'électrophysiologie *in vivo*, d'optogénétique (technique qui permet d'activer des neurones grâce à l'expression d'un canal sensible à la lumière), de comportement et d'immunohistochimie. Le calcul du nombre d'animaux a été fait afin d'obtenir un nombre suffisant de données pour chaque protocole expérimental, tout en appliquant strictement les grands principes éthiques de l'expérimentation animale. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures de chirurgie se dérouleront sous anesthésie générale et des antalgiques seront utilisés. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Cette étude est importante pour comprendre l'impact des anomalies de la myéline sur le fonctionnement des réseaux neuronaux et le comportement des individus, en lien avec des pathologies psychiatriques. Nous travaillerons principalement sur le cortex cérébral car il est impliqué dans de nombreux troubles psychiatriques et mentaux. Nous espérons que les résultats de notre projet ouvrent donc la voie pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces maladies.

17200 Le Purpura Thrombopénique Immunologique (PTI) est une maladie auto-immune orpheline et bénigne du sang, elle est caractérisée par une destruction périphérique des plaquettes. Les plaquettes ainsi que les globules rouges et globules blancs, sont des composants essentiels du sang, jouant un rôle important dans la coagulation. Une thrombopénie excessive (diminution du taux de plaquette) se manifeste par un syndrome hémorragique appelé purpura cutanéomuqueux. Le PTI n'est pas un syndrome défini comme douloureux, en revanche il induit des restrictions dans le quotidien du patient comme la pratique des activités physiques et sportives afin d'éviter tout risque d'hémorragie qui pourrait s'avérer fatal. La prise en charge du PTI a pour objectif de réduire le risque de syndrome hémorragique. Cependant l'efficacité des traitements utilisés est transitoire, et aucun traitement ne permet à l'heure

actuelle de stopper la maladie. C'est pourquoi la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase préclinique consiste en l'étude de l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur et est une étape essentielle dans le développement de médicaments. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments permettant d'inhiber l'évolution du PTI. Les souris C57BL/6J ou BALB/c vont recevoir par voie intraveineuse ou intrapéritonéale une quantité définie d'anti-CD41, un anticorps qui induit la suppression des plaquettes et qui permet de mimer un PTI.

L'injection d'anti-CD41 à l'animal provoque la destruction progressive des plaquettes pour atteindre un maximum d'efficacité 6h après injection de l'anticorps. Une seule injection d'anticorps induit une déplétion aigue des plaquettes (thrombopénie transitoire), une injection quotidienne d'anticorps induit une déplétion durable dans le temps des plaquettes (thrombopénie persistante). Il n'y a pas de différence entre une thrombopénie transitoire et une thrombopénie persistante en terme d'évaluation

Les animaux vont recevoir différents traitements avant ou après induction de la maladie. Leur sang sera prélevé à différents temps, en fonction des demandes du laboratoire donneur d'ordre et dans le respect des bonnes pratiques vétérinaires, pour analyser divers paramètres immunologiques et hématologiques. Cela permettra d'étudier l'efficacité des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et sur l'évolution du taux de plaquettes. Les molécules à tester pourront être administrées par voie orale, intrapéritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée de façon préventive (1h à 15 jours avant induction de la maladie) ou curative (au moment, ou après induction de la maladie). Les souris sont mises à mort 24h après induction de la maladie dans le cas d'une thrombopénie transitoire ou au jour 5 dans le cas d'une thrombopénie persistante, la procédure pourra alors durer 16 jours maximum dans le cas d'une thrombopénie transitoire et 20 jours dans le cas d'une thrombopénie persistante.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. L'administration de l'anti-CD41 à l'animal se fait par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. Le modèle PTI n'induit pas de douleur à l'animal, la thrombopénie n'est pas une anomalie du sang douloureuse.

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 (selon les normes d'hébergement détaillées dans l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU). Les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale.

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. Une étude comportera jusqu'à 90 animaux. Le nombre total de souris prévu pour ce projet est de 1800 animaux.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester de nouveaux candidats médicaments ciblant le purpura thrombopénique immunologique. 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 facteur sanguin 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 comprenant des points limites prédictifs et adéquats

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.

17201 Ce projet a pour but de fournir, à la demande des scientifiques, des lapines gestantes suite à un protocole d'induction ovulatoire et d'insémination artificielle.

L'obtention d'un nombre suffisant de fœtus à un stade de gestation déterminé permettra au chercheur de valider que les lots de médicaments sont conformes à la commercialisation (utilisés pour le traitement des nourrissons prématurés, présentant un syndrome de détresse respiratoire).

Règles des 3RS

Remplacer : Cette technique peut faire l'objet de méthodes substitutives cependant certaines institutions pharmaceutiques réglementaires ne les ont pas encore validées nous contraignant à continuer notre process *in vivo*.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés est défini de manière à répondre aux besoins du protocole pour éviter toute utilisation d'animaux en surnuméraires

Raffinement : Dans le respect des recommandations éthiques générales, les animaux sont inséminés en fonction des besoins scientifiques et sont hébergés dans un environnement contrôlé, en présence d'enrichissement adapté à l'espèce.

Basé sur notre expérience le nombre d'animaux est estimé à 2600 femelles par an, soit un total de 13 000 femelles au maximum pour la durée totale du projet

17202 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, les ARN messagers DMPK mutés vont s'accumuler dans le noyau des cellules sous forme d'agrégats (appelés foci) et induire des dérégulations moléculaires à l'origine des symptômes chez les patients. Ainsi, la protéine MBNL1 a été identifiée comme un des acteurs moléculaires majeurs dans cette maladie. En effet, MBNL1 se lie aux répétitions anormales de l'ARN DMPK muté et se retrouve séquestré dans le noyau des cellules par les foci. Par conséquent, MBNL1 est dans l'impossibilité d'effectuer sa fonction régulatrice de la maturation de certains ARN messagers conduisant à des dérégulations dont certaines ont été associées à des symptômes cliniques.

Actuellement il n'existe pas de traitement pour cette maladie. Parmi les pistes thérapeutiques envisagées, la restauration d'un niveau fonctionnel de MBNL1 (soit par libération de MBNL1 séquestré dans les foci, soit par expression de MBNL1 exogène) dans les cellules DM1 est une approche intéressante. Nos travaux actuels ont permis de démontrer que l'expression d'une protéine modifiée (MBNL Δ) ayant une forte affinité de liaison aux répétitions peut agir comme un leurre compétiteur pour libérer MBNL1 endogène séquestré dans les foci. Cette approche permet une correction des principaux défauts moléculaires et fonctionnels observés dans les cellules DM1 et dans un modèle murin de la maladie (HSA-LR). Cette stratégie qui utilise un vecteur viral pour amener le transgène correcteur dans les tissus, a l'avantage d'avoir un effet sur le long terme. De plus ce leurre permet de libérer toutes les protéines (MBNL1, MBNL2 et MBNL3) de la famille MBNL séquestrées par les foci et les protéines encore non-identifiées.

Pour être efficace et réduire des effets secondaires, un leurre de type MBNL Δ doit lier spécifiquement les répétitions anormales et avoir une expression ciblée dans les cellules ayant des foci associant une perte fonctionnelle d'activité MBNL. L'objectif de ce projet est donc d'optimiser la construction MBNL Δ afin d'identifier le meilleur candidat thérapeutique à l'aide d'un modèle murin de la DM1. Pour se faire, le projet est divisé en 4 étapes principales : i) examiner *in vivo*, l'efficacité d'une nouvelle génération d'outils MBNL Δ optimisés ; ii) tester *in vivo* un senseur moléculaire qui permet de réguler l'expression d'un transgène MBNL en fonction du besoin de correction ; iii) comparer *in vivo* l'efficacité de constructions hybrides générées à partir des optimisations réalisées en i et ii ; iv) évaluer les 4 meilleurs candidats à court et long terme après une administration systémique.

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 des constructions MBNL Δ 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 constructions montrant *in vitro* une forte efficacité sans effet délétère seront insérées dans des vecteurs viraux et injectés à différentes doses par voie intramusculaire dans des souris DM1/HSA-LR afin de vérifier la correction des anomalies moléculaires associées à la maladie. Puis les 4 meilleures constructions

seront injectées en systémique pour évaluer les corrections au niveau du muscle ainsi que l'impact sur l'organisme en entier à court et long termes. Si les résultats sont positifs, un maximum de 1304 souris (768 souris DM1/HSA-LR et 536 souris contrôles WT) 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 des premières étapes détermine la poursuite, la mise en place et l'utilisation d'animaux supplémentaire prévue dans la troisième puis la quatrième étape.

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.

17203 Les épilepsies partielles se développent selon un parcours temporel assez reproductible. En clinique, elles sont souvent associées à un événement déclenchant, tel que fièvre, un traumatisme grave ou une infection cérébrale, qui mène, après un délai parfois long à l'émergence d'un cerveau épileptique. L'épilepsie du lobe temporal mésial (MTLE) est la forme la plus commune d'épilepsie réfractaire. La plupart des caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques de la MTLE peuvent être reproduites chez la souris par l'injection cérébrale de kaïnate au niveau de l'hippocampe (modèle KA). Le cerveau est organisé en réseau, avec une connectivité fonctionnelle propre, susceptible d'être modifiée par des états pathologiques comme l'épilepsie. L'objectif de ce projet est d'étudier les modifications apportées par l'épilepsie à cette connectivité fonctionnelle. L'étude de ces réseaux se fait par imagerie fonctionnelle en mesurant les modifications de flux sanguin cérébral entre différentes zones cérébrales. Nous utiliserons une technique d'imagerie fonctionnelle par échographie ultrarapide, qui permet d'avoir une résolution spatio-temporelle et une facilité d'utilisation bien plus importantes que l'IRM. Elle permet notamment de réaliser l'imagerie chez des animaux éveillés. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer, grâce à cette technique d'échographie ultrarapide, la connectivité fonctionnelle chez des souris rendues épileptiques après injection cérébrale de kaïnate. L'ensemble du projet est mis en œuvre dans l'application des 3 R (Remplacer, Réduire, Rafiner). 1/ Remplacement : Le développement au niveau cérébral implique des interactions cellulaires complexes, entre les cellules endothéliales, les capillaires sanguins et le tissu neuronal, neurones et astrocytes, et les cellules immunitaires. Cette complexité est difficile à reproduire *in vitro* et nécessite donc l'utilisation d'animaux notamment dans notre cas d'épilepsie focale et le remplacement complet est encore impossible. 2/Réduction : l'ensemble des expérimentations est effectué de manière à réduire le nombre d'animaux utilisés. La stratégie expérimentale se fait en étape permettant d'appréhender et d'optimiser la taille des lots expérimentaux. Le nombre d'animaux sera le plus faible possible tout en permettant de réaliser une analyse statistique des résultats. Ce projet nécessitera au maximum 44 souris, pour une durée de 2 ans. A terme, ce projet permettra de démontrer si l'épilepsie entraîne une modification de la connectivité fonctionnelle chez la souris. 3/ Raffinement : l'hébergement ainsi que les procédures seront optimisés et dans le but d'améliorer les conditions expérimentales et d'hébergement. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour diminuer la souffrance lors des interventions sur les animaux. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis. A chaque fois qu'il est possible les animaux sont hébergés en groupe dans des cages, enrichies de modules permettant de diversifier leurs activités, et sont observés au quotidien par une équipe en charge de leurs soins.

17204 La rhabdomyolyse est une maladie multifactorielle qui peut être causée par des catastrophes naturelles (séismes) mais également par la station prolongée au sol, fréquente chez les personnes âgées chutant

au domicile, des infections ou des maladies génétiques. Elle se caractérise par une destruction des fibres musculaires libérant leur contenu dans la circulation. Ce contenu est toxique hors de la cellule notamment pour les reins. La rhabdomyolyse représente jusqu'à 8% des causes d'insuffisance rénale aiguë et peut mettre en jeu le pronostic vital car il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement spécifique.

Le système du complément est un acteur de l'immunité innée, qui joue un rôle clef dans la défense contre les bactéries. Alors qu'il est normalement très finement régulé, il peut devenir nocif s'il est activé de manière excessive et se dépose alors à la surface des cellules. Au cours d'une étude précédente nous avons trouvé des signes d'activation du complément chez des patients ayant une dysfonction rénale brutale ou aiguë induite par une rhabdomyolyse (RIAKI : Rhabdomyolysis Induce Acute Kidney Injury) et l'avons confirmé dans un modèle murin de cette pathologie.

L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle des différentes voies qui mènent à l'activation du complément dans la dysfonction rénale au cours de la rhabdomyolyse. Il y a 3 voies qui permettent l'activation du complément appelées classique, alterne et des lectines et nous allons évaluer quelle voie du complément est impliquée en utilisant des souris déficitaires en composants clés de chacune des voies (C1q, pour la classique, CL-11 pour la voie des lectines) ou FB (pour la voie alterne). Il a déjà été démontré *in vitro* et *in vivo*, que l'hème, contenue en grande quantité dans les fibres musculaires, est capable d'activer le système du complément. Nous étudierons si l'hémopexine qui détoxifie l'hème et si d'autres inhibiteurs spécifiques du complément en fonction de la voie d'activation identifiée (classique, alterne ou des lectines) peuvent prévenir cet effet d'activation excessive du complément et la dysfonction rénale. Aucun traitement spécifique n'existant à l'heure actuelle, ces données représenteraient un enjeu de taille pour les patients présentant une rhabdomyolyse.

Dans notre projet, nous utiliserons, pour préciser le mode d'activation du complément, un modèle de rhabdomyolyse provoquée par injection intra-musculaire de glycérol qui est celui utilisé dans la littérature, reproduisant une rhabdomyolyse traumatique ou « crush syndrome ». Ce modèle de référence est considéré comme pertinent comparé à la maladie chez l'homme.

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 ainsi :

1) Remplace (Remplacement) : Pour ces expériences, les modèles expérimentaux *in vivo* (animaux) sont les seuls permettant d'évaluer l'impact de l'activation du complément dans un organe entier sur la dégradation de sa fonction. Nous réaliserons en parallèle des expérimentations en culture cellulaire et étudierons des analyses d'échantillons humains afin de limiter au minimum les expérimentations animales. Cependant, 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.

2) Réduire (Réduction) le nombre d'animaux en expérimentation : L'anticipation des doses adéquates à injecter par l'étude bibliographique permettent de réduire le nombre de souris utilisées. Nous utiliserons 10 souris par groupe car au cours d'expériences précédentes, nous avons calculé que le nombre de souris minimum nécessaire est de 10 afin de réaliser une analyse statistique multi-paramétrique robuste. Chaque expérience sera réalisée 2 fois pour étudier l'atteinte rénale et l'activation du complément par des méthodes différentes non compatibles l'une avec l'autre (transcriptomique, imagerie et cytométrie en flux). Les procédures démarreront sur des souris âgées de 6 à 10 semaines. Afin de valider notre hypothèse et de prouver l'efficacité de ces molécules dans nos conditions pathologiques, le nombre requis de souris est de 680 souris

3) Rafine (Raffinement) : 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 pour créer un environnement non stressant pour l'animal (ils disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi par du coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Nous utiliserons des méthodes non invasives pour les analyses d'urines et le suivi. De plus, 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.

17205 La récompense au cours des apprentissages et la prise de drogues addictives partagent la même capacité à stimuler un réseau particulier dans le cerveau, appelé réseau de la récompense. Ce réseau permet de détecter des événements, des situations et des comportements qui ont des conséquences bénéfiques pour l'animal (ou l'humain) en fonction de ses besoins. Ce réseau est capable de mémorisation ce qui rend l'animal apte à reproduire les expériences positives. Il comprend un ensemble de structures cérébrales connectées dans lesquelles les neurones qui utilisent la dopamine comme neurotransmetteur (neurones dopaminergiques) jouent un rôle crucial. Les récompenses inattendues stimulent ces neurones. De plus les drogues addictives ont comme action commune d'augmenter la dopamine dans les synapses dopaminergiques et par ce mécanisme, d'activer le réseau de la récompense. La dopamine émise module l'activité d'autres neurones dans le réseau de récompense. Notre projet est de mieux comprendre comment l'action de la dopamine sur des populations neuronales spécifiques initie certaines réponses à la cocaïne et les apprentissages par récompense. Notre animal d'étude est la souris normale et manipulée génétiquement.

1) Notre projet visera d'abord à développer chez la souris une nouvelle technique génétique pour marquer de manière indélébile des neurones qui ont été activés. Pour mettre au point et valider la technique nous utiliserons tout d'abord un modèle classique d'épilepsie pharmaco-induite afin de démontrer que les neurones sont définitivement marqués lorsqu'ils sont fortement activés. Lorsque le modèle sera validé dans le cadre des crises épileptiques nous l'utiliserons pour étudier l'effet d'activations moins intenses en réponse à la cocaïne ou lors de conditionnements opérants.

2) Dans une autre approche génétique, nous introduirons dans des neurones cibles des protéines artificielles capables de les inhiber ou les activer si les souris sont traitées par la clozapine ou la clozapine-N-oxide. Ces deux substances seront utilisées à des doses auxquelles elles n'ont aucun effet sur un animal normal. Nous rechercherons comment l'inhibition ou la stimulation de certains neurones sensibles à la dopamine affecte des réponses comportementales à la cocaïne.

3) La cocaïne ou l'apprentissage par récompense active des neurones dans des régions cérébrales spécifiques et ainsi augmente l'activité de plusieurs gènes. Pour comprendre le rôle joué par l'un de ces gènes dans des effets comportementaux de la cocaïne et le développement des apprentissages, nous bloquerons ce gène par une méthode génétique dans des régions cérébrales précises et nous en déterminerons les conséquences comportementales.

4) Pour évaluer les réponses comportementales à la cocaïne, nous étudierons l'augmentation d'activité locomotrice immédiatement après une injection de la drogue, et l'augmentation de cette réponse après une ou 5 injections de cocaïne (sensibilisation). Nous évaluerons aussi une réponse conditionnée par l'injection de cocaïne (préférence de place conditionnée).

5) Les apprentissages par récompense seront étudiés dans des boîtes de Skinner où la souris en légère restriction alimentaire devra appuyer sur un levier ou introduire son museau dans un trou pour obtenir une boulette de nourriture.

La valeur scientifique du projet a été validée par l'obtention de financements par plusieurs institutions.

Des stratégies de bon sens seront appliquées dans le respect des objectifs des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

Remplacer : Nous étudions des fonctions spécifiques du système nerveux dont l'exploration fonctionnelle requiert un cerveau avec le moins d'altérations possibles et donc l'expérimentation sur l'animal. Dans notre domaine scientifique, il est très difficile de se passer d'animaux. Certains mécanismes cellulaires peuvent cependant être étudiés sur des cellules en culture.

Réduire : La micro-injection de virus recombinants limitera la consommation d'animaux, en évitant le développement et l'élevage de plusieurs lignées de souris transgéniques.

- Quand cela sera possible et afin de réduire leur nombre, les animaux seront inclus dans plusieurs procédures successivement.

- Nos connaissances sur le modèle étudié, notamment sur les pertes liées à la chirurgie, nous permettront de limiter le nombre d'animaux nécessaires pour générer des résultats statistiquement robustes.

Raffiner : Une attention particulière sera apportée aux animaux en expérimentation. Entre les manipulations ils seront hébergés dans un milieu enrichi et leur bien-être sera observé 1 fois/jour.

- Les mutations dans les lignées transgéniques envisagées ne sont pas dommageables pour l'état de santé de l'animal.

- Toutes les précautions nécessaires seront prises afin d'éviter toute douleur, en particulier lors des interventions chirurgicales, par des anesthésies et des analgésiques efficaces. Pendant et après les opérations chirurgicales, les animaux seront traités par des antalgiques et leur comportement sera surveillé une à deux fois par jour. Des points limites seront définis au-delà desquels les souris seront euthanasiées.

- La micro-injection de virus recombinants limitera la consommation d'animaux, en évitant le développement et l'élevage de plusieurs lignées de souris transgéniques.

- Quand cela sera possible et afin de réduire leur nombre, les animaux seront inclus dans plusieurs procédures successivement.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet est de 1596 souris

17206 Notre équipe de recherche est orientée vers l'étude des maladies des neurones moteurs (ou motoneurones), caractérisées par des troubles de la motricité et une paralysie progressive. Nous étudions un gène dont la mutation provoque une forme rare d'amyotrophie spinale, affectant principalement la motricité des membres inférieurs. Les bases cellulaires et moléculaires de cette maladie sont inconnues et aucun traitement n'existe alors que les patients souffrent de symptômes ambulatoires sévères. L'objectif général de notre travail est donc de mieux comprendre le rôle de ce gène dans les motoneurones afin d'éclaircir les mécanismes responsables de la maladie et développer ainsi un modèle préclinique de la maladie pour aider à la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour cela, nous devons utiliser des modèles de souris transgéniques.

Remplacer : Néanmoins, afin de limiter l'utilisation du modèle animal, nous utilisons principalement des motoneurones humains à partir de cellules souches pluripotentes que l'on a dérivé de patients contractant la maladie. Nous favorisons fortement les expériences *in vitro* sur les motoneurones humains qui permettront de diminuer drastiquement le nombre d'animaux requis. Cependant, il est indispensable de compléter ces expériences avec un modèle murin mimant la maladie, afin d'effectuer les analyses comportementales et physiopathologiques nécessaires pour comprendre le développement de la maladie. Aucun modèle murin pour cette maladie rare n'était à ce jour disponible. Nous avons donc développé un modèle murin portant une mutation dans un gène qui chez l'humain cause la maladie. Avec ce modèle, nous souhaitons compléter avec un nombre minimum d'animaux les études permettant de comprendre les effets de la mutation sur le développement du système nerveux ainsi que sur la motricité des souris adultes, ces expériences ne pouvant être menées sur des modèles *in vitro* à l'heure actuelle.

Réduire : Les modèles murins que nous avons développés sont à ce jour les seuls modèles disponibles pour une étude physiopathologique des amyotrophies spinales infantiles. De plus, chez la souris, la période de gestation est courte et le nombre d'embryons important, ce qui nous permet de générer un nombre d'animaux suffisant pour plusieurs expériences à partir de relativement peu d'animaux fondateurs. Nous pouvons également comparer des souris de type sauvage (souris contrôles) et mutantes (portant la mutation) issues de la même portée, avec une répartition mendélienne. Pour chacune des approches expérimentales, des travaux antérieurs sur des modèles similaires nous permettront d'ajuster le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique et robuste les conditions mutantes à la condition contrôle avec une excellente reproductibilité.

Raffiner : Nos activités portent une attention particulière sur le soin et le bien-être de l'animal. Les souris sont hébergées dans un milieu enrichi et des observations du bien-être sont réalisées une fois par jour. Les souriceaux et jeunes animaux sont surveillés, afin de s'assurer que la mère s'occupe bien d'eux. Pendant toutes nos expériences, nous prenons toutes les précautions nécessaires afin d'éviter toute douleur, en utilisant des pratiques adaptées. En cas de comportements anormaux (manque de toilettage, manque d'intérêt pour la nourriture), l'état des animaux est surveillé plusieurs fois par jour.

Afin d'éviter une souffrance de la souris, les animaux sont anesthésiés et euthanasiés par des méthodes de mise à mort adaptées.

Le nombre d'animaux pour ce projet est de : 500 souris

17207 Notre projet vise à explorer les altérations des réseaux corticaux conduisant à l'émergence d'activités épileptiques. Notre objectif général est d'explorer les mécanismes fondamentaux de plasticité cellulaire et synaptique susceptibles d'offrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des épilepsies chroniques. Nous nous intéressons particulièrement aux conséquences fonctionnelles d'altérations d'expression de transporteurs et canaux ioniques observées dans le cerveau épileptique. Nos récents travaux mettent en évidence une altération du transport du chlore dans les neurones, à la fois dans le cerveau épileptique humain et dans des modèles animaux d'épilepsie. Notre projet vise à explorer le bénéfice thérapeutique d'approches pharmacologiques visant à compenser de telles altérations.

Remplacement. Notre projet fait suite à plusieurs études menées dans des systèmes *in vitro*, sur lesquelles sont basées nos hypothèses actuelles. A présent, nos travaux visent à étendre nos observations obtenues dans des modèles cellulaires et *ex vivo* afin de tester l'effets d'approches pharmacologiques et génétiques sur la survenue de crises d'épilepsie. Nos expériences reposant sur une analyse des manifestations comportementales et électroencéphalographies de l'émergence d'activité épileptiques, elles requièrent par définition une expérimentation sur l'animal.

Réduction. Ces travaux seront menés chez la Souris pour des raisons à la fois liées à la taille et au comportement de l'animal (qui facilitent plusieurs procédures expérimentales) mais également parce qu'il s'agit d'un standard dans notre domaine de recherche, ce qui facilitera la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature et de nos collaborateurs. En outre, nous aurons recours à une lignée murine génétiquement déficiente pour l'une des enzymes clés de régulation de la fonction des CCCs. Toutefois, tous les animaux mis en œuvre dans cette étude seront systématiquement utilisés pour plusieurs approches expérimentales afin de réduire leur nombre au strict minimum.

Raffinement. Pour cela, nous avons récemment développé et raffiné un modèle d'épilepsie expérimentale chez la souris (lithium-pilocarpine), conduisant à l'apparition de crises chroniques et reproduisant nombreuses caractéristiques anatomiques et cellulaires associées aux épilepsies du lobe temporal chez l'Homme. Nous testerons sur ce modèle plusieurs stratégies visant à compenser ou prévenir les altérations synaptiques et cellulaires associées à la perturbation de l'expression des cotransporteurs cation-chlore (CCCs) qui assurent notamment l'homéostasie des ions chlorure dans les neurones. Nous comparerons les effets de ces différentes approches aussi bien sur le plan anatomopathologique et sur le plan fonctionnel en monitorant l'activité électroencéphalographie des animaux et la survenue des crises à l'aide d'enregistrements EEG téléométriques. Des travaux préalables menés dans l'équipe ont permis d'optimiser considérablement la procédure d'induction d'état de mal épileptique en réduisant notamment la mortalité associée. En outre, les conditions de stabulation sont contrôlées avec enrichissement, et chaque procédure est associée à la mise en œuvre de mesures d'anesthésie, d'analgésie et de suivi visant à réduire autant que possible la souffrance animale.

Nombre total de souris utilisés dans ce projet : 846

17208 Parmi les filières de productions animales, la filière porcine est soumise à une concurrence particulièrement forte au sein de l'Union Européenne, de même qu'avec les autres bassins de production mondiaux. Dans ce contexte, la maîtrise des coûts constitue un enjeu majeur et constant pour la filière. L'aliment représente jusqu'à 69% des coûts de production. L'amélioration de l'efficacité alimentaire constitue donc un des leviers d'action important pour améliorer la compétitivité des élevages porcins. Outre ces aspects de compétitivité, la filière porcine est également interrogée par la société sur ses impacts environnementaux, l'usage des médicaments et le bien-être animal. Son acceptabilité et sa durabilité passent donc par des améliorations sur ces différents plans. L'élevage de précision semble être une voie prometteuse pour répondre à ces enjeux. Ce concept peut être défini comme le pilotage de l'élevage grâce au suivi automatisé et en temps réel de la production, de la reproduction, de la santé et du bien-être des animaux. L'objectif est d'améliorer les performances économiques, sociales et environnementales de l'élevage par une meilleure gestion du troupeau en

prenant notamment en compte les besoins individuels des animaux. Dans ce contexte d'élevage de précision, l'alimentation de précision est une technique en développement qui permet l'ajustement dynamique le plus fin possible des apports nutritionnels (en quantité et en qualité) aux besoins des animaux, afin d'améliorer l'efficacité alimentaire tout en diminuant le coût et les rejets notamment d'azote et de phosphore. L'application de ce concept nécessite de mesurer la réponse des animaux à l'alimentation (poids, épaisseur de lard dorsal, ingestion), puis de traiter ces données pour définir les besoins des animaux et la composition de l'aliment à distribuer pour répondre à leurs besoins sans excès ou manque. Enfin, des dispositifs techniques permettant de distribuer en temps réel ces aliments sont nécessaires.

Deux outils d'aide à la décision ont été développés pour 1) traiter les données individuelles des truies en gestation et en lactation, 2) déterminer en fonction des performances de chaque truie la composition de l'aliment à lui distribuer chaque jour et 3) piloter un distributeur d'aliment capable de distribuer un aliment spécifique pour chaque animal. L'objectif de ce projet est de suivre et d'améliorer ces outils d'aide à la décision en élevage expérimental pendant plusieurs cycles reproductifs. Les calculs utilisés dans l'outil doivent en effet être affinés grâce à l'apport de données réelles et permettre un ajustement le plus fin possible des apports alimentaires aux besoins des animaux. L'hypothèse est que l'alimentation de précision va permettre de réduire les rejets en phosphore et azote, le coût alimentaire et les nutriments utilisés tout en maintenant les performances des animaux. L'application de l'alimentation de précision (mélange journalier et individuel de 2 aliments) sera distribuée à la moitié des truies du troupeau sur plusieurs cycles consécutifs au cours des 5 ans à venir (soit un maximum de 446 truies). Les performances des truies nourries avec l'alimentation de précision seront comparées à celles nourries avec l'alimentation conventionnelle (1 aliment pour toutes les truies pendant la gestation et 1 aliment pour toutes les truies pendant la lactation).

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement: les mesures sur les animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de mesurer les réponses des truies à leur alimentation. Ces travaux ne peuvent se faire autrement que sur un animal entier et vivant. Les données générées dans ce travail seront ensuite utilisées pour améliorer l'outil actuel. Raffinement: cette expérimentation est réalisée dans une salle avec des équipements (station d'alimentation automatique, capteurs d'activité et de température) permettant de mesurer les performances individuelles d'animaux élevés dans des conditions proches de celles rencontrées en élevage (logement en groupe pour les truies gestantes, logement individuel pour les truies en lactation). Réduction: Nous avons réduit au minimum le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats fiables (soit un total de 446 truies sur 5 ans). Les truies de ce projet seront suivies sur plusieurs cycles consécutifs dans le but d'évaluer avec précision les effets de l'alimentation sur les performances de production, reproduction et longévité des truies tout en intégrant la forte variabilité interindividuelle généralement observée dans ce type d'étude.

17209 Les antidépresseurs (AD) sont pour l'instant, le meilleur traitement que nous ayons pour la dépression majeure. Ils sont loin d'être efficace pour tous les patients. En effet, plus de 60% d'entre eux ne répondent pas au premier AD qui est prescrit. Pour ceux qui répondent, une réponse complète n'est observée qu'après plusieurs semaines de traitement et, en cas d'échec, il peut s'écouler trop de temps avant que des options alternatives soient explorées.

Pouvoir prédire la réponse clinique à un stade précoce du traitement de la dépression est un objectif important pour le clinicien et l'impact potentiel pour les patients souffrant de dépression et pour le système de santé est très élevé.

Cependant, à ce jour, il n'y a pas de biomarqueurs précoces qui pourraient aider à la décision thérapeutique alors que cela est déjà vrai dans le cancer et d'autres domaines de la médecine. La communauté scientifique travaille depuis des années à essayer d'identifier de nouvelles stratégies de biomarqueurs. L'année dernière, ont été publiés des résultats importants décrivant l'implication d'ELK1 dans la dépression. La même publication a également décrit comment l'expression du gène ELK1 dans le sang peut aider à suivre le traitement réponse.

Ce projet de recherche, réparti sur 5 ans, va nécessiter au total 5112 souris afin de fournir un modèle murin de variabilité individuelle (i) de la réponse au stress précoce et/ou tardif ainsi que (ii) de la réponse aux antidépresseurs, d'identifier les gènes et les réseaux de gènes qui montrent des

changements durables dans l'expression et dont la régulation est associée à l'indice de vulnérabilité dans (iii) le sang, (iv) le cerveau pour (v) identifier les « biomarqueurs précoces de réponse au traitement AD » dans des modèles animaux de dépression pour développer de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse AD et permettre d'évaluer de nouveaux traitements. Ce nombre d'animaux est nécessaire pour notre projet de recherche, car il est essentiel d'étudier à la fois les modifications moléculaires face au stress en fonction du temps, et aussi de tester différentes classes des antidépresseurs et des doses de celles-ci.

Dans la conception du projet selon la règle de 3R, même si nous nous efforçons au maximum de remplacer nos modèles animaux avec des modèles cellulaires, les effets de la dépression, du stress, et des antidépresseurs se produisent à l'échelle de l'organisme. Les procédures d'expérimentations animales décrites ici sont donc essentielles pour mieux comprendre la signification des événements moléculaires causés par le stress ou les antidépresseurs sur des circuits neuronaux intacts.

Aussi, pour réduire au maximum le nombre des animaux : la collecte de différentes régions du cerveau et tissus chez un seul animal ; batteries adaptées d'une série des tests comportementaux chez un seul animal ; protéomique et transcriptomique chez un seul animal ; histologie et imagerie chez un seul animal. Un effort particulier est aussi fait pour le raffinement avant d'éviter toute détresse non nécessaire : suivi proche et régulier du bien-être des animaux ; protocoles utilisés optimisés pour exposer les animaux au minimum de stimuli adverses et que pour les temps d'expérimentations soient les plus courts possibles.

17210 Les épendymomes sont des tumeurs touchant le système nerveux central tant au niveau cérébral que médullaire. Ce projet est consacré à comprendre le développement des épendymomes médullaires, tumeurs toujours bénignes mais qui, en raison de leur localisation, sont responsables de déficit neurologique sévère (paraparésie ou tétraparésie), spontanément ou à cause du traitement chirurgical qui est toujours très délicat.

Il s'agit d'une tumeur rare dans la population et plus fréquente dans la Neurofibromatose de type 2, maladie génétique prédisposant au développement de schwannomes, méningiomes et épendymomes. Nous souhaitons développer un modèle souris de ce type tumoral, lignée d'épendymome souris Nf2 muté, car il n'y a pas d'autres modèles disponibles, y compris *in vitro*. Par une recherche bibliographique extensive, nous avons identifié un marqueur spécifique des cellules épendymaires situées dans la moelle épinière (FOXJ1). Par des techniques de knock-out conditionnelles, nous allons obtenir par croisements successifs des souris invalidées spécifiquement au niveau des cellules épendymaires pour le gène Neurofibromin 2 (Nf2) à différents stades du développement. Nous aurons à générer et à suivre sur une période de 15 mois, quatre groupes de souris (4 à 5 souris par cage) avec une activation de la recombinaison par injection de tamoxifène en prénatal, à la naissance et en post-natal (et un groupe pour analyse intermédiaire) avec un groupe témoin soit 197 souris au total, ce qui est le minimum pour une analyse statistique du phénotype tumoral. Le stress subi par les souris sera minimal puisque'elle seront simplement surveillées cliniquement pendant la durée du protocole.

Même s'il est probable que les lésions tumorales obtenues soient de petite taille, asymptomatiques et découvertes à l'examen histologique post-autopsie, les souris seront surveillées cliniquement régulièrement et nous rechercherons un déficit de la mobilité des pattes avant et arrière avec comme conséquence tardive des problèmes d'alimentation possible d'où la surveillance du poids hebdomadaire (sacrifice si perte de poids de plus de 20% ou si déficit de la mobilité des souris clairement établi).

17211 La cornée est le tissu le plus densément innervé de l'organisme. Les nerfs cornéens assurent la sensibilité proprioceptive (sensation de toucher) et nociceptive (sensation de douleur et de variation de température) et jouent un rôle important dans le réflexe de clignement des paupières, de production de larmes et de cicatrisation cornéenne.

De nombreuses études ont mis en évidence le lien entre la dysfonction de l'innervation cornéenne et l'apparition d'atteintes cornéennes. Ces atteintes vont de la simple sécheresse oculaire jusqu'à des pathologies cécitantes comme la kératite neurotrophique.

Environ 285 millions de personnes dans le monde souffrent de déficience visuelle sévère, dont 10% liées à une atteinte cornéenne. De même, parmi les 40 millions de personnes aveugles dans le monde, plus de 1.5 millions sont atteints de pathologies cornéennes.

L'atteinte de l'innervation cornéenne est fréquemment responsable des pathologies cornéennes entraînant une baisse importante d'acuité visuelle. Ces atteintes peuvent être secondaires à de nombreuses pathologies infectieuses ou inflammatoires de la cornée. Aucun traitement n'est actuellement disponible en routine malgré le nombre important de patients concernés. Dans ce projet, nous allons étudier le développement et l'organisation des axones cornéens en utilisant des lignées de souris exprimant des protéines fluorescentes dans les nerfs cornéens et les cellules immunitaires. Le but est de mieux comprendre comment les nerfs cornéens se mettent en place et interagissent avec les cellules de la cornée, en conditions normales, en visualisant les cellules et les nerfs de manière simultanée. Ceci permettra dans un second temps de déterminer comment ces interactions sont perturbées en conditions pathologiques. Ce travail est la suite d'une étude précédente qui a permis de caractériser les meilleures lignées murines pour l'étude des nerfs cornéens. Les lignées utilisées permettent d'atteindre une résolution très fine et de visualiser axones et cellules individuellement ce qui n'est pas possible sans l'utilisation de lignées transgéniques.

Au maximum, 510 souris seront utilisées 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 ».

- (Remplacer) Du fait de la complexité du développement de l'innervation cornéenne et des interactions entre les nerfs et les cellules immunitaires, l'utilisation de l'animal nous 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 animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation (présence de carrés de cellulose, de bâton à ronger, de tunnel ou d'une maisonnette, avec nourriture et abreuvement à volonté).

17212 Restaurer la vision de patients l'ayant perdue est un enjeu majeur de santé publique. Dans ce projet, nous nous intéressons plus particulièrement aux patients ayant perdus les cellules de la rétine qui envoient l'information visuelle de l'œil au cerveau (cellules ganglionnaires).

La thérapie optogénétique donne actuellement de grands espoirs aux patients atteints d'une dégénérescence des photorécepteurs, neurones sensibles à la lumière de la rétine. Cependant, cette technique est difficilement applicable pour stimuler directement les centres de la vision dans le cerveau ; la lumière nécessaire pour la stimulation optogénétique est largement diffractée dans le cerveau et ne permet donc pas de cibler des aires plus profondes du cerveau de manière efficace. Les ultrasons quant à eux peuvent diffuser facilement dans le cerveau, de manière non-invasive et avec une bonne résolution spatiale. De plus, nous savons que l'utilisation des ultrasons permet de stimuler avec précision des neurones d'intérêt et peut être utilisé comme technique de neurostimulation.

Le but du projet est d'étudier la capacité d'une stimulation ultrasonore à provoquer une perception visuelle lors d'une stimulation du cortex visuel. Cette perception sera évaluée à l'aide de tests comportementaux chez la souris. Nous utiliserons des souris normales et des souris atteintes d'une rétinopathie pigmentaire congénitale. Nous pourrions ainsi évaluer la capacité à induire une sensation visuelle chez la souris aveugle.

Au total, 300 animaux seront nécessaires à ce projet de recherche.

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) Ce projet nécessite un système biologique intégré allant de l'œil au cerveau. Les expérimentations décrites dans ce projet impliquent des études comportementales. 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 et obtenir des résultats statistiquement significatifs.

- (Raffiner) Les animaux 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 si nécessaire d'une anesthésie générale ainsi qu'une administration d'analgésiques opioïdes en pré- et post- opératoire afin de prévenir la douleur lors des procédures chirurgicales. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permet une observation adaptée des animaux pour s'assurer de leur bien-être.

17213 Les gliomes de haut grade (HGG) sont des tumeurs résistantes aux thérapies et dont l'hétérogénéité est de mieux en mieux documentée. Bien qu'histologiquement similaires, les HGG (et particulièrement les glioblastomes) sont apparentés à différentes classes moléculaires et métaboliques impactant leurs réponses aux thérapies conventionnelles (radio et chimiothérapies) ainsi qu'aux thérapies ciblées. Pour proposer de nouvelles thérapies l'évaluation de cette hétérogénéité devient primordiale. Des modèles de lignées cellulaires à partir de biopsies de patients susceptibles de représenter la tumeur initiale peuvent être générés chez la souris et représentent des modèles de choix. Le projet proposé concerne la validation *in vitro* et *in vivo* d'une thérapie basée sur l'inhibition de HIF1/HIF-2, facteurs hypoxiques impliqués dans le développement, la croissance et l'agressivité tumorale. Cette hypoxie est susceptible de moduler l'expression d'un certain nombre de cibles thérapeutiques comme par exemple celle de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$. De plus l'expression de cette intégrine pourrait changer le métabolisme des tumeurs. L'évolution de la progression/régression tumorale de xénogreffes de HGG chez la souris sera suivie longitudinalement en imagerie par Tomographie d'Emission de Positons (TEP), une technique d'imagerie parmi les plus sensibles, par plusieurs indicateurs de l'état tumoral. Il s'agira ainsi de caractériser les paramètres de prolifération, le degré d'hypoxie, l'activité métabolique et l'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ avec des marqueurs de TEP appropriés d'un échantillon représentatif de lignées cellulaires dérivées de patients et leurs xénogreffes, pour proposer des modèles originaux d'étude préclinique de nouvelles thérapies. 396 souris seront utilisées dans ce protocole expérimental. Cette étude respectera la règle des 3R : Remplacer : des expériences menées *in vitro* sur les lignées cellulaires, qui pourront être utilisées *in vivo*, permettent de déterminer quels modèles seront les plus pertinents pour avoir un échantillon de la diversité des tumeurs. La prolifération, le métabolisme et l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans différentes conditions expérimentales (normoxie, hypoxie) ainsi que la captation des marqueurs TEP ont été évalués *in vitro*. Seules les lignées tumorales ayant des caractéristiques compatibles avec les questions posées (métabolisme, expression ou non de l'intégrine.) seront injectées aux souris

396 souris seront utilisées dans ce protocole expérimental.

Cette étude respectera la règle des 3R :

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 gliomes de haut grade, afin de nous assurer de la réelle nécessité de poursuivre sur ces modèles animaux greffés avec des cellules tumorales .

Réduire : le nombre d'animaux dans chaque groupe a été calculé afin d'inclure le minimum d'animaux pour pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus. De plus l'utilisation de l'imagerie TEP couplée permet de suivre un même animal au cours du temps lors d'étude. Un test statistique de Mann Whitney sera utilisé pour analyser les groupes d'animaux.

Raffiner : l'environnement des animaux est enrichi (ouate de cellulose, frisure pour faire des nids), les animaux sont placés à plusieurs par cage. L'eau et la nourriture sont fournis ad libitum et la température et l'hygrométrie des pièces de stabulation contrôlées. Les souris greffées auront un suivi quotidien réalisé par du personnel préalablement formé et à l'aide d'une grille d'observation adaptée afin d'éviter toute souffrance liée au développement des tumeurs et tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, analgésie).

17214 Notre projet de recherche translationnelle et appliquée concerne une maladie humaine d'origine génétique : la dystrophie myotonique. La Dystrophie Myotonique de type 1 est une maladie génétique

causée par une expansion anormale de triplet (CTG) dans la région 3' non codante du gène DMPK, et caractérisée par une myotonie, des troubles cardiaques, des troubles cognitifs, et une faiblesse musculaire invalidante.

L'objectif de notre projet est de comprendre quels sont les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'atteinte musculaire. Les résultats auront un impact direct pour la compréhension de l'atteinte musculaire des patients, et ouvriront de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Afin de mener à bien ce projet, nous prévoyons d'utiliser 10 souris/groupe pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Un maximum de 440 souris sera utilisé.

La dystrophie myotonique est une maladie caractérisée par une atteinte musculaire progressive et d'intensité variable. Afin de couvrir au mieux cette hétérogénéité clinique, nous prévoyons d'utiliser des souris sauvages (non génétiquement modifiées) et des souris génétiquement modifiées. Les souris sauvages seront modifiées par injection intramusculaire de vecteurs viraux (AAV) pour reproduire une atteinte musculaire sévère. Les souris génétiquement modifiées que nous prévoyons d'utiliser miment soit une atteinte musculaire légère, soit une atteinte modérée. De plus, afin de comparer et d'évaluer objectivement les atteintes musculaires de ces animaux, nous voulons utiliser un modèle de dystrophie musculaire bien caractérisé.

Les animaux seront susceptibles de développer des pathologies d'ordre musculaire. Ils seront surveillés quotidiennement pour vérifier qu'ils ne souffrent pas et qu'ils sont capables de se mouvoir. Les animaux seront tous sortis de l'étude à l'issue du projet ou auparavant en cas d'application de point limite éthique afin de respecter le bien-être animal.

La dystrophie myotonique est une maladie progressive généralement absente à la naissance, et l'utilisation de cultures cellulaires (cellules immatures) ne permet pas de modéliser les défauts retrouvés à l'âge adulte. Des biopsies musculaires de patients ont été utilisées précédemment pour caractériser l'atteinte musculaire mais l'utilisation de souris est indispensable pour comprendre la physiopathologie de la maladie *in vivo*. Ainsi, les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez la souris et de mieux comprendre leur développement (REPLACEMENT).

Les souris seront analysées *in vivo*/in situ et les tissus seront prélevés post-mortem et conservés pour des expériences ultérieures éventuelles. D'autre part, le test de puissance statistique permettra d'assurer à posteriori et pour l'avenir l'échantillonnage minimal nécessaire à une différence significative dans le cadre de ces expériences (REDUCTION).

Les dystrophies sont des maladies entraînant une fragilité accrue du muscle et causant une faiblesse musculaire. Etant donné que la structure du muscle murin est similaire à la structure du muscle humain, la souris est un modèle très adapté pour l'étude des dystrophies. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, elles 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) (RAFFINEMENT).

17215 Une question centrale dans la recherche en neurosciences est de comprendre comment l'activité des milliards de neurones puisse s'organiser et se coordonner pour générer les comportements complexes dont sont capables les animaux, y compris l'homme. Les systèmes sensoriels constituent un sujet d'étude préféré parce qu'il est possible de contrôler précisément l'entrée du système par le biais des stimulations sensorielles et grâce à l'accessibilité des premiers relais neuronaux dans le traitement sensoriel. Une problématique d'une importance capitale pour le comportement animal et générale à l'ensemble des modalités sensorielles est de comprendre les mécanismes de reconnaissance de stimuli récurrents. Considérant le système auditif, nous voudrions savoir, quand on entend un bruit ou un son nouveau de façon répétée, qu'est-ce qui fait qu'à partir d'un certain nombre de répétitions il est reconnu ? Plus précisément : quels changements ont lieu dans le cerveau qui rendent compte de cette reconnaissance ?

Nous visons à répondre à ces questions générales en se focalisant d'une part sur le système auditif, pour la précision et la répétabilité des stimuli qu'il offre, et d'autre part en prenant comme modèle la souris. S'agissant d'une étude de l'activité de multiples neurones enregistrés individuellement, il faut

utiliser des électrodes intra-cérébrales, ce qui impose le recours aux animaux modèles. La souris en particulier est choisie en tant que modèle très standard et afin de pouvoir bénéficier au besoin d'approches génétiques.

Les protocoles expérimentaux impliqueront l'observation comportementale et l'enregistrement intra-cérébral de l'activité neuronale de souris exposés de façon répétée à des stimuli sonores neutres nouveaux. Le contexte comportemental sera sans ou avec renforcement, où le renforcement sera légèrement aversif ou appetitif. Le suivi de l'activité neuronale en relation avec le comportement de la souris permettra de mettre en évidence la capacité de la souris d'apprendre à reconnaître et à discriminer des stimuli sonores nouveaux et les mécanismes neuronaux qui sous-tendent notamment l'étape de reconnaissance.

Les avantages attendus du projet sont donc une compréhension approfondie des mécanismes neuronaux chez la souris lors de la familiarisation avec et finalement reconnaissance de nouveaux stimuli sensoriel. Il est attendu que les mécanismes identifiés dans le cortex auditif de la souris pourront se généraliser à d'autres espèces, à d'autres systèmes sensoriels et éventuellement à d'autres aires corticales.

Les dommages attendus concernent l'utilisation des animaux, mais selon des protocoles standards, calibrés. S'agissant d'une étude de la physiologie d'un système biologique complexe et intact, il n'est pas possible de remplacer les expériences *in vivo*. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous raffinerons les expériences en utilisant des multi-électrodes à haute densité, qui augmentent le rendement de chaque expérience. Les effectifs choisis minimiseront le gaspillage potentiel d'animaux en cherchant à établir de résultats robustes de point de vue statistique en testant des hypothèses clairement établies préalablement. Un soin tout particulier sera apporté à la prévention et à la réduction de l'inconfort, de la douleur ou du stress des animaux. Ainsi, dans les protocoles les stimuli seront neutres et le renforcement aversif sera léger. Généralement, tout inconfort, douleur ou stress des animaux sera prévenu grâce à une surveillance constante des paramètres physiologiques et un protocole d'intervention spécifique (utilisation appropriée d'anesthésiques et analgésiques) pour chaque indicateur de souffrance potentielle.

En total, 230 souris seront utilisées.

17216 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 le déconditionnement cardiovasculaire, les pertes osseuse et musculaires observés chez les spatonautes. 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 au 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. Ce protocole de suspension a fait l'objet d'une saisine précédente et est actuellement en cours d'utilisation. Ce projet souhaite investiguer l'hypothèse selon laquelle la simulation de la microgravité pourrait engendrer une altération de la consolidation du souvenir à long terme. La transmission sociale de préférence alimentaire est le modèle de choix pour tester la consolidation du souvenir car le test est éthologique robuste et a permis d'établir une partie des théories de la consolidation de la mémoire sur le long terme. Grâce au dispositif de microgravité simulée que nous avons mis en place et à ce test nous pourrions mesurer si la microgravité simulée peut altérer le souvenir d'un événement appris avant, pendant et

après l'exposition à la microgravité simulée. Les effectifs minimaux et maximaux d'animaux par groupe sont basés sur nos expériences antérieures et les données de la littérature : pour une démonstration convaincante d'un point de vue statistique 10-12 animaux par groupe seront nécessaires. 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. **REMPACEMENT** : 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 pourra être 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). **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 432 animaux sur 2 ans, de sexe mâle et femelle répartis dans les différents groupes expérimentaux. Parmi ces animaux, les animaux contrôles ne seront pas soumis à la suspension.

17217 En élevage porcin, la période post-sevrage est une période critique au cours de laquelle les animaux subissent de nombreux stress (ex. séparation maternelle, transition alimentaire, changement de bâtiment) conduisant souvent à un défaut de performances sur cette période qui impacte la performance globale des animaux et de fait entraîne des pertes économiques significatives. La supplémentation de l'aliment avec des édulcorants durant cette période, permet d'augmenter l'appétence de la ration et ainsi d'améliorer la prise alimentaire. Les performances de croissance sont, de ce fait, améliorées durant cette phase de transition.

De nombreux édulcorants pour le porcelet sont à base de saccharine. Or, cette molécule va potentiellement être retirée du marché dans les années à venir. Il convient donc d'identifier d'autres édulcorants pour remplacer les produits existants.

Dans ce cadre, une synergie de molécules sucrées a été développée spécialement pour le porcelet. Les premiers tests d'efficacité montrent des résultats positifs sur la croissance des porcelets et aucun effet délétère n'a été observé lorsque l'édulcorant était incorporé à la dose nominale de 100 g/T d'aliment. Cette dose nominale a été initialement définie grâce à des études *in vitro*.

Dans ce projet, deux doses élevées d'édulcorant (7,5 et 10 fois la dose normale) seront testées pour évaluer l'efficacité sur la croissance et la tolérance de la combinaison de molécules.

Ce projet sera réalisé chez le porcelet sevré âgé de 21 à 63 jours puisque le porc est l'espèce cible du projet. En effet, des spécificités d'espèce existent notamment sur les mécanismes de régulation physiologiques. Ainsi, les objectifs de l'essai (tolérance de l'animal) et la complexité des phénomènes étudiés (régulation de l'appétit...) ne permettent pas d'utiliser des modèles alternatifs comme la modélisation ou les études *in vitro*. Pour cette étude, nous utiliserons 216 animaux sevrés mâles et femelles, répartis en 3 groupes (TEMOIN, dose 1, dose 2). Les porcelets seront logés par case de 6, leur permettant ainsi d'avoir des interactions sociales. Les cases seront enrichies d'un jouet accroché au bout d'une chaîne, permettant aux porcelets de le manipuler. Au cours du temps, les paramètres de performance seront suivis (consommation et gain de poids). Une prise de sang sera réalisée en fin d'essai sur 72 animaux (24 par traitement) pour analyses hématologiques et biochimiques. Le nombre de tentatives de collectes d'échantillons sanguins sera limité afin de réduire la souffrance ou le stress appliqué à ces animaux. 168 animaux seront mis à mort en fin d'étude pour réaliser une analyse post-mortem des différents organes (évaluation de la tolérance sur 72 porcelets) mais également pour écarter du circuit de consommation les carcasses issues des animaux ayant consommé une dose élevée de l'édulcorant non autorisé à ce jour par les autorités. Les 48 porcelets du groupe TEMOIN, ne recevant pas l'édulcorant et n'étant pas concernés par les analyses post-mortem seront gardés en vie

et réintroduits dans le circuit conventionnel d'élevage. Le calcul du nombre d'animaux engagés dans le projet a été fait sur la base d'études précédentes et permettra de détecter des différences significatives entre les 3 groupes. Une réduction des effectifs risquerait donc de ne pas nous permettre de répondre aux objectifs du projet et imposerait donc de recommencer l'étude avec de nouveaux animaux.

17218 L'omniprésence du glyphosate dans les aliments et l'eau représente un problème de santé publique important et sa toxicité chez les mammifères fait l'objet de nombreuses controverses.

Le glyphosate agit comme un herbicide en inhibant une étape enzymatique de biosynthèse des acides aminés aromatiques présents dans les plantes, mais cette enzyme est également présente dans tous les micro-organismes, y compris le microbiote intestinal animal et humain. Alors que le microbiote intestinal fournit des avantages importants pour son hôte, en particulier dans le métabolisme, le développement du cerveau et du système immunitaire, la relation microbiote-hôte altérée est associée à de nombreuses inflammations chroniques. Ici, nous émettons l'hypothèse que l'exposition alimentaire à long terme au glyphosate (administré par incorporation dans la nourriture à la dose d'exposition maximale sans effet nocif observable de 50 mg/kg/jour autorisée en Europe) modifie la composition et / ou l'activité du microbiote. Dans la partie de ce projet impliquant cette saisine, nous étudierons l'impact secondaire potentiel des modifications du microbiote au niveau cérébral (neuro-inflammation, perméabilité neurovasculaire, activité neuronale, transmission synaptique et possible incidence sur l'autisme). Il n'y a, à ce jour, aucune publication sur ce sujet.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante :

Remplacer : L'étude globale proposée chez la souris ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau intégré d'informations.

Réduire : Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum permis par les tests statistiques. Les protocoles choisis, déjà utilisés en routine, n'induisent pas de morbidité. Le suivi longitudinal non invasif réalisé en amont (mesure de paramètres physiologiques, tests de comportement) 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. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet et 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 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 cas de complications infectieuses, une prophylaxie par antibiotiques sera mise en place.

Ce projet nécessite dans son ensemble 576 souris.

17219 Les tissus barrière comme la peau, le système digestif et la vessie, constituent un point d'entrée pour un grand nombre de pathogènes. Les macrophages sont des cellules du système immunitaire qui jouent un rôle essentiel dans la mise en place de l'immunité antimicrobienne, et sont retrouvés en abondance dans ces tissus. Plus récemment, les macrophages ont également été impliqués dans le maintien de l'activité physiologique des tissus dans lesquels ils résident, ainsi que dans leur réparation après une blessure.

Par ailleurs, nous étudierons le rôle des macrophages dans le développement de structures lymphoïdes organisées retrouvées dans les tissus adipeux comme l'omentum et le péricarde, qui jouent un rôle primordial dans l'immunité péritonéale et péricardique, respectivement.

La survie des macrophages dans ces tissus n'est pas un processus passif, et nécessite un dialogue permanent avec les cellules de leur environnement, qui produisent les facteurs de survie nécessaires au maintien des macrophages. Le but de ce projet est d'identifier la source cellulaire de ces facteurs de survie, et permettra de mieux comprendre le rôle de différentes populations de macrophages dans l'immunité des tissus barrière ainsi que dans leur fonctionnement physiologique.

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. Nous combinerons l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés et l'injection de substances biologiques. 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 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. Cette surveillance permet d'agir rapidement en cas de problèmes (agressivité, blessures, état léthargique...) et de mettre en place le protocole d'analgésie ou de mise à mort si les critères d'interruption sont atteints. Enfin, pour réduire le nombre d'animaux utilisés au laboratoire nous avons une approche collective des expérimentations, ce qui nous permet d'utiliser un même individu dans le cadre de différents projets.

Pour obtenir les résultats attendus nous prévoyons d'utiliser 570 souris sur une période de 3 ans.

17220 L'obésité et le surpoids touchent actuellement plus de 40% de la population française. L'excès de masse grasse qui caractérise l'obésité augmente le risque de nombreuses maladies. L'intestin, et notamment son microbiote et sa fonction de barrière intestinale sont altérés chez l'individu en surpoids ou obèse. Cette « hyperperméabilité » semble concourir à l'inflammation de bas grade à l'origine de leurs troubles métaboliques. Des travaux récents ont montré dans des contextes d'inflammation intestinale chronique que le maintien de la barrière intestinale était fortement dépendant de la fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales. Nous faisons l'hypothèse qu'un changement de l'environnement luminal (i.e. composition du microbiote et des métabolites produits) comme observé chez le patient obèse pourrait modifier la fonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales, induisant une hyperperméabilité intestinale, une inflammation intestinale puis systémique. L'objectif du projet est ainsi d'évaluer si les dysfonctionnements de la barrière épithéliale intestinale observés dans l'obésité sont liés à un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules épithéliales intestinales et si oui, quelles en sont la cause, en lien notamment avec les modifications de l'environnement luminal.

Trois cent vingt souris seront utilisées dans ce projet. Une première étape consistera à étudier la fonction mitochondriale chez des souris rendues obèses par la consommation d'un régime hyperénergétique pendant 12 ou 22 semaines versus des souris témoin non obèses (aliment standard) et des souris recevant les même régime (standard ou hyperénergétique) supplémentés en antioxydant. Les perturbations métaboliques de ces animaux seront évaluées par un test de tolérance orale au glucose. Une deuxième étape consistera à évaluer le rôle du microbiote intestinal dans les perturbations observées en déplaçant le microbiote d'une partie des souris en leur administrant un cocktail d'antibiotiques dans l'eau de boisson (colistine, vancomycine, streptomycine et ampicilline). Ce projet comporte 3 procédures : réalisation d'un test de tolérance au glucose, administration d'antibiotiques dans l'eau de boisson et alimentation avec un aliment hyperénergétique supplémenté ou non en antioxydant ou standard supplémenté en antioxydant.

Ce projet respecte la règle des 3R. Remplacement: cette étude de relation entre microbiote, intestin et inflammation systémique ne peut pas être réalisée *in vitro* ni modélisée *in silico*. Elle nécessite donc l'utilisation d'animaux. Réduction: l'utilisation du modèle souris permet de s'appuyer sur les nombreuses données et méthodologies existantes sur ce modèle. Le nombre d'animaux prévu permet d'effectuer des tests statistiques sans nécessité de répétition ultérieure de l'expérience. Raffinement: L'utilisation d'un anesthésique local permettra de réduire la douleur liée au prélèvement de sang. La consommation du régime hyperénergétique devrait entraîner une intolérance au glucose qui n'est pas létale pour les animaux. Les autres procédures prévues sont non invasives et les prélèvements de tissus seront réalisés après la mort. Le poids des souris et de leur comportement constitue les points limites de l'expérimentation (prise ou perte de poids excessive par rapport au poids de départ, apathie de l'animal). Ces paramètres seront évalués de façon bi-hebdomadaire.

17221 L'activité d'élevage augmente le risque de contamination de l'environnement et d'infection des animaux. Pour pallier à ce problème, l'éleveur doit assurer l'hygiène de ses bâtiments d'hébergement et protéger ses animaux par des soins adaptés (traitements des maladies ou prévention par la vaccination). Pour la vaccination, les protocoles consistent généralement en une vaccination à 4 ou 5 semaines d'âge des lapins, puis un rappel tous les 4 à 6 mois. Les lapins sont systématiquement vaccinés. Notre projet de vaccination va donc cibler une maladie virale importante pour les lapins d'élevage, comme de la faune sauvage. Cette pathologie est la myxomatose. La myxomatose est une maladie infectieuse, virulente et contagieuse pouvant engendrer de 50 à 100 % de mortalité selon les lignées de lapins (avec une durée de survie allant de 13 à 50 jours pour les souches les plus virulentes). Aucun moyen de lutte contre ce virus ne montre une protection maximum. La myxomatose n'admet donc qu'une action préventive. Les éleveurs emploient actuellement trois moyens d'action : la séparation des individus atteints, l'homéopathie et la vaccination. Le « projet » consiste développer un nouveau vaccin contre la myxomatose et de les héberger pendant un an en faisant un suivi de la durabilité de la réponse immunitaire.

Un effectif de 96 lapins répartis en trois groupes (G1 animaux témoins : 36 lapins répartis en 3 lots de 12 lapins, G2 animaux vaccinés en voie sous-cutanée (procédure réalisée par le laboratoire pharmaceutique vétérinaire) : 36 lapins répartis en 3 lots de 12 lapins et G3 animaux vaccinés en voie intradermique (procédure réalisée à le laboratoire pharmaceutique vétérinaire) : 24 lapins. Pour les sous-lots, ils comprennent 12 lapins, à envoyer chez nous aux différents temps (M4, M6 et M12). Les résultats de ce projet permettront de définir la durabilité de la réponse vaccinale dans le temps pour l'ensemble des élevages cynicoles afin de lutter contre cette pathologie virale. Cette expérimentation se place dans le respect des principes éthiques des 3 R.

Remplacement : Il n'existe aucune autre méthode permettant de démontrer la qualité et la durabilité de la réponse vaccinale *in vivo*.

Réduction : Le nombre d'animaux est calculé selon les normes la pharmacopée européenne vétérinaire. Tous les essais sur lapins prévus dans le cadre ce projet sont encadrés réglementairement et constituent des pièces du dossier d'autorisation de mise sur le marché nécessaires à la commercialisation du vaccin.

Raffinement : les groupes sociaux sont maintenus, avec le respect des groupes d'animaux formés après le sevrage lors du transport et de leur mise en parc au sol sur copeaux. Les parcs sont enrichis pour améliorer le bien-être des animaux (repose-pattes, tunnel, tasseaux de bois à ronger). Toute médication pouvant interférer avec l'efficacité du vaccin est proscrite. Cependant les animaux sont suivis plusieurs fois par jour.

17222 Ce projet concerne les traitements de la douleur neuropathique. Celle-ci, due à une lésion ou une pathologie du système nerveux, affecte environ 6% de la population. Certains antidépresseurs, anticonvulsivants et opioïdes représentent actuellement les meilleures thérapies disponibles, mais elles ne sont pas efficaces chez tous les patients et leurs effets secondaires sont nombreux. Le mécanisme conduisant à la douleur neuropathique, ainsi que les mécanismes d'action des traitements actuels ne sont que très partiellement connus, mais les données précliniques déjà existantes ouvrent des pistes pour de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Le projet vise à évaluer l'efficacité d'une combinaison thérapeutique entre un antidépresseur aminergique et un ligand sigma, dont l'efficacité à déjà été démontrée dans le cadre de la douleur neuropathique. La combinaison vise à terme à diminuer les doses nécessaires à l'effet thérapeutique de l'antidépresseur utilisé seul et donc les effets secondaires associés. Cet effort préclinique nécessite des modèles reproduisant la condition neurologique ainsi que sa réponse aux traitements existants.

Remplacer : de tels modèles ne peuvent être obtenus que grâce à l'animal car la douleur est un processus intégré. Ce projet vise à tester des molécules et leur combinaison pour évaluer leur capacité à soulager la douleur neuropathique. Il nécessitera un maximum de 1648 souris (sur une période de 5 ans) et sera conduit en réduisant chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'en optimisant les procédures.

Réduire : les animaux étant quasiment consanguins la variabilité phénotypique est considérablement diminuée, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux tout en mettant en évidence un effet statistiquement significatif.

Raffiner : les animaux (souris) sont hébergés de 3 à 5 par cage. Chaque cage est enrichie avec de la frisure pour faire un nid, ainsi qu'avec un morceau de bois. Les procédures chirurgicales se feront sous anesthésie. Des points-limite sont systématiquement établis afin de permettre à l'animal de se soustraire à la souffrance. Le non-déplacement des points limites sera une préoccupation essentielle.

17223 Ce projet de recherche vise à comprendre comment les rythmes journaliers de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique sont contrôlés par les horloges circadiennes cérébrales, ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant les effets synchroniseurs des facteurs nutritionnels sur ces horloges. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra d'améliorer la prévention et le traitement des maladies métaboliques, comme le diabète ou l'obésité.

Le projet sera conduit sur des souris de type sauvage ou génétiquement modifiées pour phénotyper leur rythme journalier d'activité-repos, leurs rythmes journaliers alimentaire et métabolique, pour tester l'influence de régimes alimentaires - enrichi en gras ou réduit en méthionine - sur la rythmicité journalière et pour mieux comprendre les mécanismes d'anticipation des repas qui impliquent notamment le cervelet.

L'ensemble du projet nécessitera 1448 animaux sur la durée du projet, soit 5 ans.

Les procédures utilisées pour étudier les rythmes circadiens nécessitent d'héberger systématiquement les rongeurs en cages individuelles, ce qui constitue un stress modéré d'isolement. Certains régimes alimentaires particuliers vont modifier d'une manière ou d'une autre la régulation du métabolisme énergétique. Plus précisément, le régime enrichi en gras et en sucres favorise le surpoids et le diabète alors qu'un apport limité en méthionine et une restriction alimentaire temporelle ralentissent la prise de masse, voire peuvent induire une perte de masse corporelle.

Une attention particulière sera portée aux aspects éthique de la recherche sur animal en respectant les règles des 3 R.

En terme de Remplacement, la régulation des cycles journaliers de la prise alimentaire et du métabolisme impliquant plusieurs organes à la fois (notamment, cerveau, foie, pancréas, surrénales, muscles), l'investigation des interactions entre horloges circadiennes et nutrition nécessite l'utilisation de modèles animaux, en parallèle aux études ciblant un organe, ou une partie d'organe, menées *in vitro*.

En terme de Réduction, le nombre d'animaux proposé (n=6 par point-horaire pour 4 temps par 24h) est basé sur une évaluation de la puissance statistique qui prend en compte les moyennes et la dispersion des données comportementales recueillies dans des études antérieures. Dans toute la mesure du possible, nous privilégions le suivi longitudinal des animaux, qui permet de limiter le nombre d'individus utilisés. Dans la plupart de nos procédures (sauf phénotypage PE1 et PE5), nous limitons notre investigation à l'un des deux sexes, mâle ou femelle en fonction de la question scientifique posée, ce qui permet de réduire de 50% le nombre d'animaux étudiés pour une expérience donnée.

En terme de Raffinement, lors des mesures des rythmes circadiens, les rongeurs seront stabulés en cages individuelles pour enregistrer les variables individuelles qui dépendent de caractéristiques circadiennes propres à chaque individu. Cependant, les cages seront ouvertes, de sorte que les animaux garderont des contacts olfactifs et auditifs avec leurs congénères maintenus dans la même pièce. En outre, dans les cas où une roue d'activité est disponible dans la cage (procédures PE4 et PE5), cela favorise un enrichissement de l'environnement pour l'animal. De plus, les cages seront systématiquement enrichies d'un morceau de bois à ronger et d'un matériel de nidification.

Par ailleurs, bien que ce projet nécessite des procédures invasives, le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (environnement enrichi, anesthésie et analgésie profondes, suivi du score de douleur). De plus, l'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement.

Des points limites prédictifs ont été établis permettant d'interrompre les procédures et soustraire ainsi l'animal à la souffrance.

17224 Le mélanome est un cancer de la peau extrêmement agressif du fait de sa capacité à se disséminer dans tout l'organisme sous la forme de métastases.

Récemment deux nouvelles options thérapeutiques ont vu le jour améliorant considérablement les chances des patients atteints d'un mélanome pour lesquels il n'existaient auparavant qu'une chimiothérapie très peu efficace. L'arsenal thérapeutique consiste aujourd'hui en: -D'une part les thérapies ciblées ciblant spécifiquement des protéines dérégulées dans les tumeurs et qui entraînent leur prolifération anarchique. Ces thérapies dites ciblées sont efficaces à court terme chez environ 50% des patients mais tous les patients développent rapidement une résistance au traitement; -D'autre part, des thérapies visant à mobiliser les défenses immunitaires du patient contre les cellules cancéreuses, appelées immunothérapies. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une immunothérapie bloquant l'interaction entre PD1/PDL1. En effet, afin d'échapper au système immunitaire, les cellules de mélanome vont exprimer une protéine appelé PDL1 qui va se lier à une protéine appelé PD1 sur les cellules immunitaires entraînant leur inhibition. Ce traitement est efficace chez 30% des patients avec une régression tumorale à plus long terme. Le challenge actuel est de mieux comprendre les mécanismes responsables de la réponse ou au contraire de la résistance à ce type de traitement afin d'être capable d'en augmenter l'efficacité.

Dans ce cadre nous souhaitons nous intéresser à l'implication du métabolisme cellulaire des cellules tumorales dans les mécanismes de résistance à l'immunothérapie.

Le nombre total de souris utilisées dans ce projet est de 3120 réparties en 8 procédures.

Conformément à la réglementation éthique en vigueur, qui impose de remplacer les animaux, chaque fois que cela est possible, par des modèles *in vitro*, nous avons, au début de ce projet *in vitro* et démontré l'importance du métabolisme cellulaire dans les mécanismes de résistance à l'immunothérapie. En tenant compte des exigences de réduction, également exigé par la législation, nous avons choisi d'utiliser un nombre minimum de souris par groupe expérimental (10 souris) qui nous permet d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Dans un souci de remplacement, des expériences préliminaires *in vitro* ont été menées et ont permis de mettre en évidence l'importance du métabolisme pour les cellules tumorales pour la mise en place de mécanismes de résistance à l'immunothérapie. Cependant ces expériences *in vitro* ne permettent pas de prendre en compte toute la complexité des interactions qui existe entre une tumeur et le système immunitaire. A l'heure actuelle et à notre connaissance, il n'existe pas de modèle alternatif pertinent permettant l'étude des interactions tumeur-système immunitaire. Il est donc maintenant indispensable de confirmer ces résultats chez la souris. En ce qui concerne le raffinement, les souris seront maintenues dans un milieu enrichi (igloo et tiges qui permettent aux souris de réaliser un nid) et celles-ci seront hébergées en portoirs ventilés à raison de 5 souris maximum/cage (500cm²). Nous réaliserons aussi une imagerie *in vivo* qui est une méthode non invasive permettant un suivi continu de chaque souris et permet l'arrêt de l'expérience avant tout début de mal- être ou de souffrance.

17225 Afin de préparer au mieux la première administration d'un futur médicament chez l'Homme, des études réglementaires de Toxicologie et de Pharmacologie de Sécurité doivent être réalisées chez l'animal (références réglementaires ICH M3, S3, S6, S7, S8, S9). Les études de Toxicologie permettent de déterminer l'exposition des animaux au produit, de définir les doses pouvant être administrées lors des premières études cliniques chez l'Homme et de sélectionner les formulations optimales. Les études de Pharmacologie de Sécurité permettent 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 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, des modèles expérimentaux prenant en compte ces potentielles alertes.

Ce projet couvre l'utilisation de souris, rats, cobayes, hamsters et lapins.

Les procédures de ce projet visent ainsi à administrer aux animaux, en dose unique ou répétées, un composé par la voie d'administration prévue chez l'Homme à des doses croissantes. Des prélèvements biologiques (sang, urine...) sont réalisés à différents temps afin d'analyser les potentiels effets de ce composé sur la physiologie de l'animal. D'éventuelles phases chirurgicales peuvent être nécessaires pour la pose d'implants de télémétrie pour le suivi de la température corporelle ou celui de paramètres cardiovasculaires. Le degré de gravité attendu sera de classe modérée, sauf pour les composés ayant un mécanisme d'action connu pour avoir des effets secondaires, pour lequel le degré de gravité attendu pourra être sévère. Une surveillance quotidienne et une attention particulière, permettront de détecter et soulager tout inconfort, douleur, ou détresse de l'animal qui irait au-delà du niveau attendu.

Les expérimentateurs sont formés et habilités aux gestes techniques impliquant l'utilisation des animaux selon les bonnes pratiques vétérinaires, et à l'observation des signes cliniques relatifs au bien-être de l'animal tout au long de son existence.

A la fin de la procédure, les animaux sont euthanasiés afin de récupérer si nécessaire des tissus et d'évaluer les potentiels effets du composé testé sur les organes, à l'exception des animaux équipés d'un implant de télémétrie qui pourront être réutilisés en accord le vétérinaire clinicien et le responsable du projet.

Actuellement aucune méthode alternative n'est validée pour remplacer les études réglementaires effectuées sur l'animal de laboratoire en vue de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). Afin de limiter le recours aux animaux, les molécules testées *in vivo* sont sélectionnées sur la base des résultats obtenus dans les modèles cellulaires et informatiques. Le nombre d'animaux utilisés dans les études de Toxicologie et de Pharmacologie de Sécurité est basé sur les lignes directrices internationales (ICH) et se limite au strict nécessaire pour atteindre l'objectif scientifique.

Ces 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, manipulations, expérimentations...), ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal et d'appliquer, quand cela est possible, la règle des « 3R » : Raffinement, Remplacement et Réduction. Les designs expérimentaux seront optimisés à chaque fois que scientifiquement possible en réduisant le nombre d'animaux utilisés, et des raffinements apportés :

En promouvant l'habituation progressive des animaux aux techniques de manipulation et en optimisant ces dernières pour qu'elles engendrent le moins d'inconfort possible.

En privilégiant à chaque fois que possible les méthodologies de prélèvements sanguins miniaturisés.

En réduisant l'inconfort des animaux lors des administrations, mesures ou prélèvements de fluides biologiques par : la mise en place de techniques non invasives sur animaux vigils, l'utilisation de systèmes de contention et/ou de recueil plus confortables, l'application de crème anesthésiante en topique, l'apport d'enrichissements/sur-enrichissements environnementaux, alimentaires et/ou ludiques favorisant leur bien-être.

En limitant la durée des manipulations et/ou d'isolements temporaires des animaux, favorisant les périodes de regroupements collectifs à chaque fois que possible.

Nombre maximum d'animaux utilisés sur 5 ans

Souris 35600 - Rats 19800 – Cobayes 950 - Lapins 130 – Hamsters 150

17226 L'objectif du projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique de cellules souches neurales associées à un traitement (codé pour des raisons de confidentialité) contre la toxicité amyloïde (déficits de mémoire induits) dans un modèle non-transgénique de la maladie d'Alzheimer. Prestation de service pour l'industrie.

Le modèle de la maladie d'Alzheimer sera induit chez la souris par une injection intracérébroventriculaire du peptide Abeta25-35 (ou peptide à séquence aléatoire pour les contrôles). Ces mêmes souris recevront le greffon de cellules souches grâce à un cadre de stéréotaxie. Les cellules seront injectées au niveau de l'hippocampe droit. Enfin les souris recevront le traitement du client afin d'en évaluer son potentiel thérapeutique.

Les déficits de mémoire, et leur éventuelle réversion par la greffe/traitement, seront analysés par des tests classiques de neuropharmacologie: Labyrinthe en Y et Piscine de Morris.

Le client travaille sur la mise en place de stratégie de thérapie génique et cellulaire de maladies neurodégénératives pour lesquelles il n'existe aucune thérapie. Pour cela des cellules souches pluripotentes murines (mESC) différenciée en cellules souches neurales seront utilisées. Pour ce projet, les cellules exprimeront la GFP.

Le traitement du client est appliqué à la fois au niveau de l'abdomen et de la tête afin de comprendre l'effet de la modulation du microbiote intestinal sur le cerveau, il est donc indispensable que l'étude soit effectuée sur un système *in vivo*. Il n'est donc pas possible de supprimer l'utilisation d'animaux vivants pour cette étude.

L'étude comprend 10 groupes recevant des traitements différents avec N=12 souris par groupe, soit au total 120 souris analysées. Le nombre d'animaux a été décidé en accord avec le client pour obtenir une étude la plus pertinente possible en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés (nombre limité de doses et contrôles nécessaires à la rigueur scientifique). Le nombre d'animaux par groupe est le nombre minimum permettant une analyse statistique cohérente dans les analyses utilisées en connaissant le modèle utilisé décrit dans de nombreuses publications scientifiques. Afin de répondre à la règle des 3R tous les animaux seront réutilisés pour chacune des procédures décrites dans ce projet. L'évaluation de points limites (perte de poids, signes cliniques...) permettant d'évaluer la souffrance animale sera de rigueur tout au long du protocole afin de répondre aux exigences de réduction et de raffinement. Les animaux seront placés dans des cages adaptées enrichies avec du matériel de nidification ainsi que de la nourriture et de l'eau de boisson à volonté. Un examen clinique quotidien sera effectué durant lequel la souffrance éventuelle des animaux sera évaluée.

17227 La saisine correspond à l'élevage d'une lignée mutante de souris en vue d'étude du cancer mammaire. Nous avons mis en évidence que ces souris mutantes développent plus rapidement des tumeurs. C'est un modèle préclinique essentiel pour comprendre la carcinogenèse mammaire et proposer de nouvelles pistes thérapeutiques. Dans cette saisine d'élevage, il n'y a pas d'expérimentation, seulement de l'élevage de ces souris, et maintien de colonie.

Remplacement : Nos souris mutantes développent spontanément des tumeurs mammaires. Les souris sont indispensables à ce projet car la carcinogenèse mammaire implique un dialogue entre la glande mammaire et les autres organes de la souris, qui ne peut pas être reproduit *in vitro*. Cette étude permettra de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du cancer du sein.

Réduction : le nombre de souris est limité au minimum pour maintenir la colonie et produire les animaux nécessaires pour notre étude.

Raffinement : Les souris sont stabulées dans des portoirs ventilés avec un enrichissement du milieu au niveau de la litière avec par exemple du coton. Les souris sont suivies quotidiennement et à partir de 8 semaines lorsque des tumeurs mammaires apparaissent, un suivi visuel et par palpation et pied à coulisse est réalisé. Si le zootechnicien constate l'apparition d'une masse de plus de 1.5cm³, il doit le signaler immédiatement et l'équipe de recherche demande la sortie de l'animal en vue de prélèvement post-mortem ou l'euthanasie dans les plus brefs délais.

400 souris développant des tumeurs seront produites sur la durée du projet : 5 ans.

17228 Bien que la luzerne possède un fort pouvoir tampon intrinsèque et une composition biochimique intéressante pour la nutrition et la santé des chevaux, peu de données scientifiques existent sur ses intérêts. La luzerne déshydratée reste donc peu utilisée dans la filière équine française, alors qu'elle pourrait remplacer une partie des céréales dans l'alimentation des chevaux. Le présent projet vise à

mener une étude pour déterminer la quantité de luzerne à substituer aux céréales de la ration afin d'observer un effet optimal sur la santé de l'estomac et de l'intestin du cheval.

Les chevaux inclus dans l'étude sont dix hongres Trotteur Français adultes répartis en cinq groupes de deux individus afin de tester la substitution d'une partie des céréales (orge) de la ration par de la luzerne déshydratée ou un autre aliment (son de blé) servant de témoin. Deux niveaux de substitution de l'orge sont testés. Les chevaux reçoivent donc à tour de rôle cinq régimes différents. L'étude est composée de cinq périodes de trois semaines, séparées par deux semaines de repos. Dans le schéma expérimental utilisé, chaque cheval est son propre témoin puisque chaque paire teste les cinq régimes dans un ordre différent. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en ayant la puissance statistique nécessaire à l'étude. En effet, les chevaux sont conduits en conditions contrôlées et uniformes afin de minimiser les variations liées à l'environnement.

Les prélèvements nécessaires à l'évaluation des modifications des paramètres des écosystèmes microbiens gastrique et fécal des chevaux ont lieu le dernier jour de chaque période expérimentale. Ils sont donc séparés de cinq semaines. Ils consistent en un prélèvement de contenu gastrique par sondage naso-gastrique, et en une fouille rectale pour obtenir des fèces. Concomitamment un prélèvement sanguin est réalisé via la veine jugulaire afin de mesurer des paramètres de l'inflammation et de l'absorption chez le cheval. Durant l'essai cinq prélèvements gastriques, fécaux et sanguins sont donc réalisés par cheval.

Pendant les périodes expérimentales les chevaux vont au paddock en groupe et sont exercés quotidiennement au marcheur. Durant les périodes de repos, les chevaux vont au pré en groupe. 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.

17229 Les néoplasies myéloïdes chroniques représentent des cancers du sang fréquent dont les mécanismes d'invasion du sang et de la moelle osseuse (site de production de toutes les cellules sanguines) par les cellules tumorales sont relativement mal connus et pour lesquelles les thérapies actuelles sont assez peu efficaces. Il s'agit de pathologies relativement bénignes initialement et durant d'assez longues périodes chez l'homme mais pouvant plus ou moins fréquemment se transformer en pathologies beaucoup plus agressives entraînant la mort des patients en quelques semaines.

Afin de développer des stratégies thérapeutiques innovantes et plus efficaces, il est nécessaire de mieux comprendre comment des altérations au niveau de certains gènes entraînent le développement de ce type de tumeur et comprendre le mécanisme d'action de certains médicaments actuellement utilisés pour envisager de développer des approches thérapeutiques plus performantes. Les objectifs du projet sont donc de mieux comprendre le développement et l'évolution des pathologies myéloprolifératives (néoplasies myéloïdes chroniques) et de développer des tests visant à démontrer l'intérêt potentiel et le mode d'action de nouvelles thérapeutiques.

Afin de répondre à ces questions, nous allons utiliser 3 lignées de souris transgéniques, qui après croisement permettent d'obtenir deux modèles de souris reproduisant les premières étapes des néoplasies myéloïdes chroniques humaines. Certaines de ces lignées présentent un phénotype dommageable (développement de tumeurs). Un suivi de ces souris sera réalisé (apparence globale, croissance, posture) afin de mettre en évidence des signes de souffrances qui conduiront à leur euthanasie.

La deuxième étape du projet consistera à créer une perturbation au niveau des cellules sanguines chez ces souris (2 lignées de souris contrôle et 2 lignées de souris modèle de la maladie). Pour cela nous injecterons par voie intrapéritonéale une molécule connue pour entraîner l'éclatement des globules rouges et donc une anémie (une seule injection à des souris éveillées, la voie d'injection est non douloureuse). Cette procédure permettra de déterminer la vitesse de production des globules rouges chez les souris malades par rapport à des souris contrôles. Pour cela, un prélèvement sanguin sera

réalisé au niveau de la joue sans recours à l'anesthésie (geste non douloureux) juste avant l'euthanasie des souris.

La troisième partie du projet consistera à faire des greffes de cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules sont présentes dans la moelle osseuse et sont à l'origine de toutes les cellules sanguines. Ce sont en partie ces cellules qui sont altérées dans leur fonctionnement lors de cancers du sang. Afin de déterminer si les cellules souches hématopoïétiques des souris malades ont des modifications fonctionnelles entraînant le développement du cancer, nous mettrons en place le modèle suivant. Nous purifierons les cellules souches hématopoïétiques à partir de la moelle osseuse de souris transgéniques (obtenue après l'euthanasie de ces animaux). Puis nous les injecterons par voie intraveineuse (injection non douloureuse dans la veine de la queue sur souris éveillée) à des souris normales préalablement irradiées. L'irradiation, processus indolore, est une étape indispensable, car elle permet de "faire de la place" au niveau de la moelle osseuse afin que les cellules greffées puissent y proliférer et s'y différencier en cellules sanguines. Les souris éveillées sont placées dans un équipement spécifique générant des rayons RX (durée 15 minutes maximum). Ce modèle permettra de reproduire plus précisément la pathologie humaine en faisant co-exister à la fois des cellules normales et des cellules malades. Nous suivrons le développement de la maladie en réalisant des prélèvements de sang une fois par semaine (prélèvement au niveau de la joue sur souris éveillée). Toutes les souris seront euthanasiées au plus tard 3 mois après le début de la procédure. Ce modèle sera également utilisé pour étudier les mécanismes d'action de 4 médicaments. Ces molécules seront administrées soit par voie sous-cutanée, par gavage à l'aide d'une sonde souple ou par injection intrapéritonéale (toutes les voies d'administration sont non douloureuses et réalisées sur souris éveillées et ne nécessite pas d'administration d'antidouleur).

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R (remplacement, réduction et raffinement). 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. Nous utiliserons 1338 souris sur les 3 ans que durera le projet. Nous utiliserons 450 souris transgéniques permettant de générer les 2 lignées de souris contrôle et les 2 lignées de souris malades. Pour le test d'éclatement des globules rouges, 288 souris seront nécessaires (4 groupes x 3 souris par groupe x 8 temps d'analyse x 3 expériences indépendantes). Enfin 600 souris seront utilisées pour les expériences de greffe et de test des molécules thérapeutiques. Chaque groupe expérimental sera composé de 10 souris afin d'avoir des résultats statistiquement interprétables, les expériences seront reproduites 3 fois de manière indépendantes et 4 molécules ayant un potentiel thérapeutique seront testées. Pour l'ensemble de ce projet, nous nous attacherons à veiller au bien-être des animaux. Pour cela une surveillance quotidienne sera réalisée et une grille d'évaluation de leur comportement sera tenue et différents critères seront scorés chaque semaine 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, nous aurons recours à l'euthanasie. Les procédures n'excéderont pas 90 jours dans la grande majorité des cas, mais pourront aller jusqu'à 18 mois pour les souris transgéniques incluses dans la procédure d'élevage. Les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure.

17230 La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie rare, progressive et irréversible, de mauvais pronostic, avec une survie médiane de 2,5 à 4,5 ans, et une incidence estimée entre 0,2 et 7,4 cas pour 100 000 habitants par an en Europe. Elle est caractérisée par une inflammation pulmonaire et une fibrose principalement localisées dans le tissu interstitiel du poumon. Ainsi altérés, les poumons ne parviennent plus à assurer correctement leur fonction respiratoire.

La cause de fibrose et de la réparation progressive du tissu pulmonaire reste inconnue. A l'heure actuelle, il existe très peu de médicaments contre la fibrose qui permettent de ralentir l'évolution de la maladie. Les traitements connus présentent des effets secondaires tels que des troubles digestifs chez 60% des patients et l'efficacité sur la mortalité causée par la FPI n'a pas encore été démontrée. C'est pourquoi l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques est nécessaire.

La phase préclinique qui consiste à étudier l'action des agents pharmacologiques *in vivo* chez le rongeur est une étape essentielle dans le développement de médicaments à visée anti-inflammatoire et anti-fibrotique. Ce projet a pour but de tester de nouveaux médicaments anti-inflammatoire et anti-fibrotique.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou le rat WISTAR. L'administration de la Bléomycine à l'animal par voie intratrachéale sous anesthésie gazeuse ou par voie sous-cutanée va permettre d'induire la FPI. Les molécules à tester peuvent être administrées par voie orale, intranasale, intrapéritonéale, intratrachéale, intraveineuse ou sous-cutanée, de manière préventive (1h à 28 jours avant induction de la maladie) ou curative (au moment, ou après induction de la maladie). Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie pulmonaire non visible pouvant être traduites par une perte de poids, une prostration légère et/ou un poil légèrement hérissé. Les signes cliniques peuvent être observés à partir du 6ème jour après induction de la maladie et peuvent durer 5 à 7 jours. Une surveillance quotidienne des animaux y compris les week-ends est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les souris sont hébergées par 5 maximum dans des compartiments de 530 cm² à fond plein sur portoir ventilé et les rats sont hébergés par 3 ou 4, en fonction de leur poids, dans des compartiments de 1820 cm² à fond plein sur portoir ventilé (selon les normes d'hébergement détaillées dans l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU).

Les animaux seront ensuite mis à mort par inhalation de dioxyde de carbone (CO₂), selon la réglementation en vigueur, 1-28 jours (en fonction des études) après induction pour analyser différents paramètres immunologiques et histologiques.

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 (5 études chez le rat + 15 études chez la souris), incluant au maximum 90 animaux, soit 1800 animaux au total (450 rats au maximum et 1350 souris au maximum).

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, de la fibrose 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 grâce à l'utilisation d'une grille de score clinique comprenant des points limites prédictifs. Mais aussi l'utilisation d'anesthésique afin de ne pas stresser l'animal durant l'administration de la Bléomycine.

-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.

17231 Ce projet consiste à tester une nouvelle approche non invasive de suivi d'un traitement antitumoral (composé X) chez la souris. Ce traitement antitumoral a montré son efficacité dans plusieurs modèles murins dont le mélanome à métastases pulmonaires, les mélanomes étant des tumeurs pour lesquelles les possibilités thérapeutiques sont encore limitées chez l'humain. Il est donc important de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour combler le besoin médical actuel. Le développement d'une telle thérapie passe nécessairement par l'étude en modèle murin mimant la pathologie dans le but de déterminer ses mécanismes d'action et ses différentes interactions. Les modèles murins sont indispensables en cancérologie car ils permettent une forte reproductibilité du développement de la tumeur en offrant la possibilité de suivre la progression de la tumeur ainsi que l'effet du traitement.

Fort des résultats de protection obtenus dans le modèle murin de mélanome à métastases pulmonaires, il est désormais indispensable de déterminer la biodistribution et l'élimination du composé X afin de caractériser certains de ses mécanismes d'action et d'étudier son innocuité. L'installation des nodules pulmonaires peut engendrer sur le long terme des complications respiratoires aux souris. Il est cependant important de préciser que l'étude prendra fin avant que ces complications n'apparaissent, celles-ci n'étant pas nécessaires au bon déroulement de l'expérimentation. Le bien-être des souris sera

surveillé au cours de l'étude pour vérifier que nous n'observons pas l'apparition de ces complications. Dans le cas contraire, nous mettrons fin à l'expérimentation.

Pour cette étude un maximum de 26 souris de la lignée C57BL/6 sera utilisée dans ce projet dans le respect de la règle des 3R.

-Remplacement : Une approche *in vitro* a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et la méthode de suivi du composé X mais cela ne reproduit pas un modèle complexe permettant la validation de notre stratégie.

-Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet. Le suivi du composé X sera effectué par imagerie *in vivo*, cette procédure nous permet de diminuer autant que possible le nombre d'animaux utilisés.

-Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les normes réglementaires, en animalerie A2 à raison de 5 souris maximum par cage sur des portoirs ventilés et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Le suivi du composé X par imagerie *in vivo* permet de réduire le mal être des animaux grâce au caractère non invasif de la procédure. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une surveillance systématique de points limites. Les procédures sont réalisées par du personnel déjà formé aux sciences et techniques des animaux de laboratoire.

17232 L'effet positif, sur la santé animale (souris) et humaine, de divers probiotiques a été démontré à plusieurs reprises, au niveau de l'amélioration du profil métabolique, mais également au niveau de la réduction de la prise alimentaire et ainsi dans l'aide à la perte de poids.

Les études réalisées chez le chat sont, elles, peu nombreuses. Il a, cependant, été montré que les chats obèses possèdent un microbiote différent de celui des animaux en condition corporelle optimale. Pouvoir modifier le microbiote d'un animal obèse et tenter de rétablir le microbiote d'un animal sain par l'utilisation de probiotiques ajoutés à la ration alimentaire constituerait un outil facilement utilisable dans cette espèce. Actuellement, au sein de l'Union Européenne, seul un probiotique, *E. faecium* SF68, peut être utilisé chez le chat comme le chien.

Cette deuxième étude est similaire en tout point à la première. Elle doit être réalisée d'un point de vue réglementaire afin de s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats. L'étude cherche à montrer que d'autres microorganismes (formule confidentielle) pourraient également être utilisés, sans danger pour l'animal, et avoir des effets très bénéfiques et être considérés comme probiotiques. L'objectif est de montrer la présence, dans les selles, des microorganismes utilisés. Une étude ultérieure pourrait réunir des preuves de l'effet thérapeutique du mélange de probiotiques envisagé sur le syndrome métabolique et les problèmes de constipation chez le chat.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de la thématique de notre unité de recherche dont un des objectifs est d'identifier des thérapeutiques innovantes afin de lutter contre le syndrome métabolique.

Les chats recevront individuellement, chaque matin, durant 5 semaines, une petite fraction de leur ration quotidienne à laquelle sera ajoutée soit une dose de microorganismes (probiotiques présumés) soit le composé de charge (identique à celui utilisé pour le mélange de microorganismes). Suite à une période de wash-out de 21 j, les deux groupes seront inversés, la deuxième période expérimentale durera également 5 semaines. Plusieurs paramètres essentiels seront évalués tout au long de l'étude et le fait qu'ils ne soient pas affectés servira de preuve quant à l'innocuité du mélange utilisé.

Pour poursuivre cet objectif, nous sommes susceptibles de mettre en oeuvre les procédures suivantes qui concerneront 12 chats : évaluation de la température corporelle, analyses sanguines (biochimie et numération formule) ainsi qu'une évaluation des coefficients de digestibilité alimentaire.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R.

Remplacer : Le chat est l'espèce cible et il n'existe pas de modèle ou moyen alternatif qui ne soit pas *in vivo*.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse statistique descriptive.

Raffiner : Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long du protocole par leur observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées seront les plus adaptées pour réduire toute souffrance et tout dommage que pourraient ressentir les animaux. Les chats seront anesthésiés lors des prises de sang de façon à limiter le stress chez les animaux très craintifs.

17233 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 néfastes durant un traitement à long terme sur des animaux sains. Nous souhaitons maintenant établir l'effet thérapeutique 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 dans une première étude 72 souris qui seront réparties 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 après la greffe tumorale (une semaine de délai pour le premier projet). Au bout de deux semaines suivant la greffe, 8 animaux par groupe seront sortis de l'étude pour des analyses hématologiques et histologiques. Cela permettra de déterminer l'impact des molécules sur la formulation sanguine avant l'apparition des tumeurs. Les autres animaux seront étudiés pour déterminer l'évolution des tumeurs qui apparaissent généralement trois semaines après injection.

Lorsque nous aurons établi la cinétique de la croissance tumorale, nous réaliserons une étude complémentaire afin de prélever des tissus nécessaires à l'analyse histologique et moléculaire, avec un nombre réduit d'animaux (8 par groupe) et en n'utilisant que le composé ayant montré la meilleure efficacité dans la première étude. Ce prélèvement sera effectué au temps le plus tardif possible de l'évolution de la croissance tumorale, déterminée dans l'étude précédente. Cela nous permettra de comprendre l'effet des composés sur la croissance tumorale mais aussi sur les paramètres sanguins associés.

Le nombre total d'animaux sera de 72 + 24 animaux soit 96 souris.

REDUCTION : l'effectif de 10 souris constitue une taille de groupe optimale pour une recherche d'effets thérapeutique à moyen terme et 8 animaux correspondent à l'effectif optimal pour effectuer les analyses sanguines et histologiques pertinentes. Ces deux tailles de groupes ont été définies et validées durant les nombreux protocoles effectués dans notre institut avec le même animal. 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.

17234 Depuis décembre 2019, un nouveau coronavirus SARS-CoV2 est apparu et s'est rapidement propagé dans le monde entier, entraînant une urgence de santé publique mondiale. Le SARS-CoV2 est le virus responsable de la maladie appelée COVID-19. Le manque de vaccin et d'antiviraux a révélé un besoin urgent d'études *in vivo* pertinentes afin d'évaluer de nouvelles molécules potentiellement anti-SARS-Cov2. Un modèle de souris génétiquement modifiées pour être sensibles au virus SARS-Cov2 a été décrit dans la littérature. Ces souris, disponibles dans le commerce sont un outil de choix pour étudier la pathogenèse du SARS-CoV2 et pour évaluer les vaccins et les produits thérapeutiques COVID-19.

L'ambition de ce projet est de proposer une plateforme technologique, à destination de futurs clients, académiques ou privés, où ces souris sensibles au virus seront utilisées pour tester de nouvelles molécules antivirales pour le traitement de la COVID-19.

Pour comprendre les différents mécanismes biologiques et l'influence du système immunitaire de l'hôte sur le virus, il est en effet crucial à ce stade, d'utiliser un organisme vivant dans son ensemble. Différentes techniques *in vitro* ont déjà été utilisées en amont.

Une attention toute particulière est portée sur le nombre d'animaux utilisés dans le projet. Nous travaillons avec une compagnie spécialisée dans les biostatistiques. Cette collaboration nous permet d'utiliser le nombre strictement nécessaire pour chaque expérience et de l'optimiser durant toute la durée du projet. Le nombre calculé de souris nécessaires sera au maximum 2000 sur 2 ans. Le nombre estimé d'animaux est entre 50 et 1000 souris / an sur 2 ans. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude peut varier de 20 à 100, en fonction du nombre de groupes différents à générer dans chaque étude (nombre de molécules antivirales à tester, doses différentes de la molécule antivirale). Le nombre d'études variera en fonction de la demande des utilisateurs de la plateforme. Cet écart dans le nombre d'animaux par étude justifie la fourchette d'évaluation du nombre de souris requises pour une année.

Le bien-être de l'animal sera en permanence au centre de nos préoccupations. Les souris sont hébergées dans des cages à 22 ± 2 °C et $50 \pm 10\%$ d'hygrométrie, en portoirs ventilés ou isolateurs, 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 chaque semaine. Des sacs dégradables contenant la litière sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid, comme enrichissement du milieu. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que les procédures ne débutent. Les conditions d'expérimentation font l'objet d'un suivi attentif du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement par la structure en charge du bien-être animal.

Pour le confort de l'animal, la prévention du stress est intégrée aux procédures expérimentales par l'utilisation d'une anesthésie gazeuse (isoflurane) pendant tous les gestes douloureux, lors des différentes injections des traitements potentiels (injection intraveineuse, injection intra-urétrale, injection intra-musculaire).

Tout animal présentant des signes de douleur, souffrance ou stress sera euthanasié. Les points limites utilisés sont:

- Le suivi quotidien du poids
- La combinaison de plusieurs des signes cliniques : posture courbée, piloérection, difficulté respiratoire, prostration ou perte d'activité, perte de réponse à un stimulus. Une grille de scoring permettra le suivi quotidien et une intervention précoce en cas de signes dus à la pathologie.

17235 CD146 est une protéine d'adhésion de la jonction endothéliale et est impliquée dans le maintien de l'intégrité vasculaire, en contrôlant notamment l'infiltration de produits sanguins dans les tissus sous-jacents. Cependant, son rôle dans l'athérosclérose et ses complications vasculaires telles que les

calcifications vasculaires n'est pas élucidé à ce jour. C'est pourquoi nous proposons d'étudier le potentiel de CD146 comme cible thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires, grâce à un modèle de souris invalidée constitutivement pour le gène CD146, modèle généré dans notre laboratoire. L'espèce animale utilisée sera la souris car la meilleure façon d'étudier les fonctions d'une molécule dans un contexte physiologique puis pathologique est de l'analyser *in vivo* à travers la physiopathologie animale. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des « 3R-Réduction/Remplacement/Raffinement » sera appliquée. Ainsi, une expérience pilote a été réalisée sur 6 animaux (3 animaux sauvages et 3 animaux déficients en CD146) pour chaque protocole. Puis, nous utilisons actuellement le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de tests statistiques dans une seconde série d'expériences selon la méthode statistique pour le calcul d'effectif, soit un total de 96 souris. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire répercutée au niveau des flancs de l'animal), si l'animal est prostré ou en retrait. De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal de la naissance à la mort grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agissons en conséquences.

17236 L'actuelle pandémie à SARS-CoV-2 a débuté à Wuhan (Chine) à la fin de l'année 2019. Son origine fait toujours débat entre une transmission directe du SARS-CoV-2 de la chauve-souris à l'Homme ou une transmission indirecte via un hôte intermédiaire avec d'éventuels événements d'adaptation du virus. Cependant, à ce jour, aucun hôte intermédiaire défini n'a été identifié, bien que des espèces telles le pangolin ait été mises en cause.

La pandémie de Covid-19 est régie par la transmission directe entre humains, mais des exemples de transmission du virus de l'homme à l'animal ont été observés chez des animaux de compagnie ou des visons d'élevage, ainsi qu'à l'inverse des exemples de transmission du virus de l'animal à l'homme.

Les études d'infection expérimentale par le SARS-CoV-2 chez l'animal ont eu pour premier objectif d'identifier un modèle animal sensible au virus afin d'en étudier le pouvoir pathogène, et de mieux comprendre les mécanismes d'infection. Ainsi, des espèces telles que la souris, le hamster doré, le furet et le macaque sont devenus des modèles de choix pour les expérimentations par le SARS-CoV-2. Ils permettent ainsi d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques, de vaccins avec l'objectif de mieux contrôler la pandémie actuelle.

Le hamster doré est un modèle expérimental qui présente une forte sensibilité au SARS-CoV-2 (atteintes respiratoires, perte de poids) ainsi qu'une forte réceptivité (multiplication du virus dans les poumons) et qui focalise donc particulièrement l'attention des chercheurs. Le hamster doré est un petit rongeur appartenant à la même famille que le campagnol terrestre et le campagnol des champs. Ces deux espèces ont la particularité de présenter des cycles de pullulation notamment dans les milieux d'activité humaine (champs, cultures céréalières, pâtures). Ainsi la forte sensibilité/réceptivité du hamster doré au SARS-CoV-2 questionne sur celle de ces deux espèces sauvages et leur potentiel rôle d'hôte intermédiaire.

Le présent projet propose de vérifier la sensibilité/réceptivité des campagnols au virus SARS-CoV-2 et ainsi mieux définir un potentiel rôle d'hôte intermédiaire de ces animaux. Les élevages de campagnols n'existant pas, des captures sont réalisées dans des zones de pullulations connues par une équipe spécialisée. Une seule procédure expérimentale courte (15 jours) sera menée. Pour chaque espèce, des groupes de 5 à 6 animaux seront infectés (par voie intranasale avec une dose bien définie selon nos études précédentes) puis mis à mort à différents temps afin de réaliser un suivi longitudinal de l'infection (recherche du virus dans différents organes d'intérêt, notamment les poumons). Le projet prévoit l'utilisation de 26 campagnols terrestres et 28 campagnols des champs (résultats des campagnes de piégeage). Ces campagnols seront hébergés en cage individuelle avec un enrichissement composé de nombreux tunnel, abris (afin de satisfaire leur besoin de cachette), et de bâtonnets de bois à ronger. Ils auront à disposition de la nourriture fraîche renouvelée quotidiennement (salades, carottes, choux, graines de tournesol, pommes). Un contrôle de leur état de santé sera mené tous les jours lors du nourrissage et une pesée sera pratiquée deux fois par semaine afin d'éviter une perturbation trop importante des animaux. Des points limites précis et suffisamment précoces pour leur éviter toute souffrance prolongée et inutile ont par ailleurs été définis.

17237 Un système immunitaire à part entière est à l'œuvre dans l'intestin, et joue un rôle déterminant dans la tolérance alimentaire, mais également dans la lutte contre les infections intestinales ou encore les cancers de l'intestin. Dans l'ensemble de ces processus, les « cellules présentatrices de l'antigène » jouent un rôle essentiel, en échantillonnant leur environnement (aliments, bactéries, virus, cellules cancéreuses), puis en rapportant ces échantillons (« antigènes ») aux lymphocytes T, les effecteurs du système immunitaire, afin que ceux-ci assurent la tolérance aux antigènes non dangereux (soi, aliments...) ou au contraire éliminent les cellules dangereuses pour l'organisme (infectées ou cancéreuses).

L'échantillonnage de l'environnement par les cellules présentatrices de l'antigène a été largement étudié *in vitro*, mais *in vivo*, les cellules présentatrices de l'antigène réalisent cette fonction dans un environnement extrêmement dense et riche en informations diverses. Leur fonctionnement est donc très vraisemblablement dépendant de chaque tissu. Nous souhaitons comprendre comment elles réalisent l'échantillonnage au niveau de l'intestin grêle, en raison du rôle essentiel de cet organe dans la tolérance alimentaire et le risque infectieux.

Remplacement : Des études *in vitro* ont mis en évidence le rôle régulateur du cytosquelette (le squelette moléculaire de la cellule, qui assure ses mouvements) dans ce processus. La localisation et l'activation du cytosquelette déterminent si les cellules présentatrices de l'antigène migrent, ou échantillonnent l'environnement, ces deux événements étant exclusifs. Par ailleurs, des études *ex vivo* ont également démontré le rôle essentiel de protéines à la surface des cellules présentatrices d'antigène pour leur migration dans l'intestin et leur accès direct au contenu de celui-ci (où se trouvent aliments et potentiels pathogènes). Nous souhaitons étudier la morphologie, la migration, et l'échantillonnage des cellules présentatrices de l'antigène compétentes et déficientes pour ces protéines dans l'intestin, afin de comprendre leur rôle physiologique. Seules des expériences *in vivo* peuvent nous permettre de comprendre comment les cellules présentatrices échantillonnent le contenu de l'intestin pour assurer la tolérance alimentaire et la défense contre les pathogènes.

Réduction : Nous comparerons la morphologie et la migration des cellules présentatrices de l'antigène dans l'intestin grêle de souris sauvages et de souris mutantes par microscopie bi-photonique. La microscopie bi-photonique est un outil puissant qui nous permettra d'analyser un nombre réduit de souris et d'obtenir des résultats d'une grande valeur. Pour cela, une chirurgie fine sans réveil est réalisée pour exposer l'intestin et l'observer au microscope en conditions physiologiques. Cette méthodologie est la seule permettant d'appréhender ce processus complexe *in vivo*, dans les conditions physiologiques du tissu.

Raffinement : Les souris sont anesthésiées pendant toute la durée de la procédure, et un analgésique est utilisé pour limiter les dommages lors de l'imagerie. Il s'agit d'une procédure sans réveil.

Ce projet inclut 44 souris au total.

17238 Dans le cadre du développement de nouvelles molécules, l'utilisation du modèle animal s'avère encore nécessaire, notamment pour les pathologies humaines qui font intervenir des systèmes de régulation complexe.

Dans ce projet, nous souhaitons mettre en place au sein de notre institut un nouveau modèle d'induction de l'hypertension cardiaque, dans le modèle souris.

Cette approche nous permettra d'étudier le rôle de certaines protéines, mais aussi l'efficacité de traitements luttant contre l'hypertension.

Ces animaux recevront des pompes miniatures, implantées sous la peau, qui diffuseront un ensemble de molécules qui déclencheront l'apparition d'une hypertension d'origine cardiaque.

Nous maîtrisons déjà la méthode d'implantation de ces pompes, et souhaitons obtenir des données de base sur la fonction cardiaque après cette induction pharmacologique, ainsi que sur les dommages tissulaires en résultant.

Cette étude pilote s'écoulera sur une période de 28 jours de traitement durant laquelle les animaux seront étroitement surveillés, avec notamment une échographie et un électrocardiogramme.

Le modèle Souris nous permet d'accéder à des animaux génétiquement modifiés, permettant d'étudier l'ensemble des fonctions d'une protéine au sein d'un organisme complet adulte.

Il s'agit d'une approche très utile pour déterminer la fonction d'une protéine dans un organisme vivant et ainsi orienter le développement de nouveaux médicaments.

Nous avons déjà effectué une première demande pour mettre en place ce modèle, en suivant les recommandations des publications, mais avons observé une mortalité qui n'était pas documentée, lors de sa mise en place.

Dans ce nouveau projet, nous allons modifier le protocole anesthésique mais aussi tester deux doses pour compléter et finaliser ce développement.

De notre première étude, nous avons pu conserver l'ensemble des animaux contrôles qui ne seront pas concernés par cette nouvelle demande.

Deux conditions expérimentales seront testées dans cette étude afin de valider la meilleure approche pour induire une hypertension tout en n'observant pas de mortalité.

Chaque groupe expérimental sera constitué de 10 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).

Par ailleurs, nous prévoyons 10 animaux supplémentaires afin de pallier à toute mortalité durant la procédure chirurgicale, liée notamment aux interactions pharmacologiques entre analgésique et produits hypertenseurs.

Nous souhaitons donc employer un total de 30 souris pour ce protocole.

REPLACEMENT : nous ne disposons pas d'une autre possibilité d'étudier la fonction d'une protéine dans un organisme vivant 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 le protocole pharmacologique n'entraîne 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 molécules 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.

17239 En cancérologie, l'une des approches thérapeutiques actuellement utilisées est basée sur l'utilisation de globules blancs du patient, modifiés pour se retourner contre un marqueur de la tumeur à traiter. Cette méthode d'immunocytothérapie utilise le système CAR (chimeric antigen receptor, ou récepteur antigénique chimérique) et des lymphocytes T du patient modifiés *ex vivo*, appelés CAR-T. L'idée d'appliquer cette technique thérapeutique à d'autres contextes pathologiques dans lesquels un marqueur spécifique d'une cible à détruire (antigène) est exprimé, a émergé, notamment dans le domaine de la fibrose myocardique. Dans ce contexte, une protéine spécifiquement exprimée par les cellules responsables du développement de la fibrose a été identifiée et pourrait constituer une cible pour des cellules CAR-T dirigées contre ce marqueur.

Des essais très encourageants ont été menés dans des modèles murins de fibrose myocardique. Une maladie humaine dans laquelle cette approche pourrait être très intéressante est la myopathie de Duchenne. Dans cette maladie, qui touche à la fois les muscles et le cœur, une fibrose progressive s'installe et contribue à la dégradation clinique des patients. Le modèle animal qui se rapproche le plus fidèlement de la maladie humaine est le chien atteint par cette même maladie, due à une mutation dans le gène de la dystrophine. Notamment, et contrairement au modèle murin mdx, les chiens développent une fibrose dans leurs muscles et leur cœur, et représentent donc un modèle particulièrement pertinent

pour évaluer l'efficacité de ces CAR-T anti fibrose. Néanmoins, avant de démarrer une étude d'efficacité dans ce modèle, il est nécessaire de vérifier la faisabilité du prélèvement de lymphocytes par aphérèse (méthode de tri des cellules du sang, comme pour un don de plaquettes) chez le chien, de leur modification *ex vivo*, d'évaluer la tolérance des chiens à l'injection de CAR-T ainsi que la dose optimale et la fréquence nécessaire d'injections. Ce projet constitue donc une étude préliminaire, préparatoire de l'étude thérapeutique proprement dite. Ce projet inclura deux chiens, qui subiront une aphérèse, puis trois injections à dose croissante de CAR-T pour l'un, et des injections répétées sur une durée maximale de 3 semaines pour l'autre. Un suivi clinique étroit sera effectué, ainsi que des prélèvements sanguins réguliers, afin d'évaluer la tolérance de ces animaux à l'injection de CAR-T. Nous serons ainsi attentifs au principal risque de cette injection, celui d'un orage cytokinique, qui peut survenir chez les patients humains après une injection de CAR-T. Dans le cas où ce syndrome se manifesterait chez nos animaux, nous leur administrerions une thérapie anti-inflammatoire adaptée.

Remplacement: cette stratégie thérapeutique a été validée sur des modèles *in vitro*, puis dans des modèles rongeurs. La faisabilité de l'aphérèse, de la production de CAR-T, de la tolérance à l'injection de CAR-T et de la dose optimale dans l'espèce canine sont autant de questions qui ne peuvent être posées *in vitro* et nécessitent de l'être dans l'espèce cible.

Réduction : nous avons limité le nombre d'animaux à deux, ce qui nous semble le nombre minimal afin de pouvoir valider la procédure. Nous ne ferons pas d'analyse statistique sur ces animaux donc nous n'avons pas besoin de davantage d'individus.

Raffinement: la procédure d'aphérèse sera réalisée sous anesthésie générale car elle dure deux-trois heures et serait stressante sur animal vigile. Cette procédure sera pilotée par un hématologue expert de l'aphérèse pédiatrique. Un suivi vétérinaire quotidien sera assuré tout au long de la procédure. En cas de survenue de complications de type orage cytokinique, la thérapie adaptée sera mise en place. Les deux chiens seront hébergés ensemble, auront à leur disposition des jouets, des plateformes, un lieu de couchage (corbeille + tapis). Ils bénéficieront d'interactions quotidiennes avec leurs soigneurs (caresses, jeux), et d'une sortie quotidienne dans des espaces de jeux intérieur et extérieur aménagés.

17240 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 est disponible commercialement, mimant les symptômes du lupus (modèle appelé MRL-lpr). 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.

Pour cette étude, nous allons utiliser 696 souris dite "MRL-lpr".

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 notre hypothèse.

17241 La Tomographie par Emission de Photons (TEP) est une technique d'imagerie médicale qui permet de mesurer différentes fonctionnalités des organes, comme par exemple le métabolisme, grâce à l'injection intraveineuse d'un produit marqué avec un radio-isotope, le radioligand. La neuro-imagerie TEP médicale est utilisée pour le diagnostic des maladies neurologiques (la schizophrénie, l'épilepsie, ...), des maladies neurodégénératives (la maladie Alzheimer, Parkinson, ...), ou pour le suivi thérapeutique de ces maladies. L'utilisation d'un radioligand en clinique est l'étape ultime d'un processus de recherche et développement. Le développement d'un ligand commence par une sélection *in vitro* (critère physico-chimiques, affinité...), suivi d'une validation en préclinique et d'une évaluation en clinique. Un bon radioligand est métaboliquement stable, passe la barrière hématoencéphalique et montre une bonne affinité et spécificité pour sa cible. Nous développons et validons *in vivo* des nouveaux ligands qui peuvent avoir un intérêt dans le diagnostic précoce des maladies neurodégénératives (maladie Alzheimer, Parkinson et Huntington). Ces radioligands ciblent en particulier des structures spécifiques pour chaque maladie : des protéines synaptiques, des cibles immunitaires afin de détecter la neuroinflammation ou encore des systèmes récepteurs affectés par la pathologie. Un ligand à haute spécificité permettra d'établir un diagnostic précoce et/ou un suivi thérapeutique.

L'objectif de ce projet est d'effectuer la validation de 5 nouveaux ligands *in vivo* chez le petit animal. Différentes étapes sont indispensables au processus de validation. Ces études ont comme but d'évaluer le passage de la barrière hémato-encéphalique des ligands, évaluer la pharmacocinétique, la spécificité et sélectivité *in vivo* du ligand chez l'animal sain mais également dans des modèles qui sur- ou sous-expriment la cible étudiée. Pour ces études, nous utiliserons des rats car la taille du cerveau est mieux adaptée à la résolution limitée des caméras TEP par rapport le cerveau des souris. Dans ce projet, les modèles rats seront obtenus par injection stéréotaxique dans une structure cérébrale (striatum ou hippocampe) d'une toxine ou d'un vecteur viral, ce qui induit l'expression d'une cible dans des structures homogènes et bien identifiables par imagerie TEP. Les modèles seront unilatéraux, ce qui permet d'utiliser le côté controlatéral comme contrôle interne réduisant ainsi le nombre d'animaux.

Les expériences seront réalisées sur 900 rats pour une validation de 5 radioligands sur une période de 5 ans. Le nombre d'animaux a été calculé de tel façon que statistiquement les résultats permettront conclure sur un « Go » ou « No Go », des différentes étapes qui composent le processus de validation avec un risques d'erreur inférieur à 5%.

Cette étude respecte et prend en compte le règlement 3R :

Réduction: Les ligands qui seront choisis pour ce projet, auront déjà passé une première sélection/évaluation *in vitro*, limitant ainsi le nombre d'expériences *in vivo*. Ensuite, ce projet décrit toutes les étapes requises pour la première validation *in vivo* d'un radioligand ; or, si certaines informations sont déjà connues, ces étapes ne seront pas répétées. De même, les expérimentations seront arrêtées si les résultats n'atteignent pas les critères requis pour passer à l'étape suivante.

Raffinement : Nous prenons en charge de l'analgésie et de l'anesthésie systématique pour toutes les chirurgies, ainsi que l'analgésie post-chirurgicale. L'imagerie est également effectuée sur des animaux anesthésiés et monitorés pour leurs paramètres physiologiques. Les rats seront hébergés par deux en milieu enrichi. Enfin, nous n'effectuons que des injections stéréotaxiques unilatérales, pour que le phénotype des modèles animaux soit modéré et permette à l'animal de se comporter normalement sans séquelle. Des points limites liés à l'anesthésie, la chirurgie et l'imagerie qui emmènent à

l'interruption d'une expérience seront mis pris en compte afin d'éviter toute souffrance animale. L'euthanasie comme point limite ne sera appliqué que si l'animal se réveillerait avec des séquelles nuisibles.

Remplacement : Une première sélection et validation des ligands est au préalable effectuée *in vitro*. Seul les ligands avec des caractéristiques prometteuses seront ensuite évalués *in vivo*. La validation *in vivo* est néanmoins indispensable, car le comportement d'un ligand *in vitro* ne reflète pas tout à fait la situation *in vivo* (disponibilité sanguine, distribution, métabolisme...).

17242 La sclérose latérale amyotrophique (SLA), encore appelée maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative de l'adulte liée à la dégénérescence des neurones moteurs dans le système nerveux central. Elle conduit à une paralysie progressive entraînant le décès des patients dans les quelques années suivant le diagnostic, d'insuffisance respiratoire le plus souvent. Environ 10 % des cas de SLA sont des formes familiales, dans lesquelles des gènes ont été identifiés, notamment le gène SOD1. A ce jour, malgré de nombreuses pistes thérapeutiques explorées, aucune thérapie efficace n'est disponible pour ces patients. Chez le chien, une maladie analogue à la SLA, nommée myélopathie dégénérative, est présente dans de nombreuses races, et des mutations dans le gène SOD1 ont été identifiées comme associées à cette maladie. Les chiens atteints présentent, comme les patients, une paralysie progressive à partir de l'âge de 8-10 ans. Leurs propriétaires sont amenés à prendre la décision de les faire euthanasier lorsqu'ils ne sont plus capables de déambuler de manière autonome, et/ou lorsqu'ils présentent une incontinence urinaire/fécale. Ils constituent donc un modèle spontané de SLA très pertinent, et un essai clinique vétérinaire sur des chiens atteints par cette maladie pourrait apporter des réponses précieuses sur l'efficacité d'un candidat médicament, à la fois sur la maladie du chien et de l'Homme. C'est la stratégie qui est envisagée pour valider l'efficacité d'un anticorps dirigé contre CD38, une protéine notamment exprimée par les neurones. CD38 participe au contexte inflammatoire et à la dégénérescence neuronale décrits dans de nombreuses maladies neurodégénératives dont la SLA. Diminuer l'activité de CD38 permettrait donc de ralentir voire stopper la dégénérescence des neurones moteurs et l'évolution de la maladie. Un anticorps anti-CD38 aux propriétés innovantes a donc été développé, et un essai clinique vétérinaire est envisagé chez des chiens atteints de myélopathie dégénérative. En préparation de cet essai, il est nécessaire de déterminer la dose optimale d'anticorps à administrer, ainsi que le rythme de réinjections nécessaire. Quatre doses seront testées chez douze chiens beagle sains d'âge moyen (5 ans), à raison de trois chiens par groupe. L'anticorps sera injecté par voie intraveineuse sous la forme d'une perfusion lente. Des prélèvements sanguins répétés seront effectués afin de doser le médicament, ainsi que différents marqueurs de son efficacité. Des prélèvements de liquide cérébro-spinal (plus proche du tissu cible, le système nerveux central) seront également réalisés sous anesthésie générale. Un mois après l'injection, les animaux seront euthanasiés, afin de prélever différents organes, notamment le système nerveux central.

Remplacement: de nombreuses données sur l'anticorps ont déjà été obtenues *in vitro* sur cultures cellulaires, montrant son mécanisme d'action et des réponses cellulaires prometteuses. Des essais dans des modèles murins de maladies neurodégénératives ont ensuite permis de confirmer le potentiel majeur de cet anticorps *in vivo* dans le cadre de ces maladies. L'effet bénéfique attendu chez des chiens malades est donc significatif et une amélioration de la survie et de la qualité de vie de ces chiens peut être raisonnablement espérée. Il n'est pas possible de déterminer la dose optimale dans l'espèce cible sans utiliser des chiens pour cela. Réduction: le nombre de chiens (3 par dose) correspond à l'effectif minimal permettant de réaliser une comparaison des profils de pharmacocinétique et de déterminer la dose optimale. Raffinement: Les chiens seront hébergés en petits groupes d'animaux, auront des jouets divers à leur disposition, un lieu de couchage, une plateforme, et bénéficieront d'une sortie quotidienne en groupes avec jouets et pataugeoires. Les procédures le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale, avec une analgésie adaptée. Aucun dommage lié aux procédures expérimentales n'est attendu pour les animaux, mais une attention particulière sera portée à une possible toxicité hématologique de l'anticorps, qui ne devrait néanmoins pas se manifester aux doses testées et suite à une seule injection.

17243 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. 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 externe associé à une défibrillation précoce. En l'absence de reprise d'activité cardiaque spontanée, une approche pourrait être l'insertion d'un ballonnet gonflable dans les vaisseaux afin d'induire une occlusion aortique : le REBOA (Retrograde Endovascular Balloon Occlusion of the Aorta). Cette approche doit permettre d'augmenter la pression de perfusion coronarienne et de favoriser une reprise d'activité cardiaque spontanée. Cependant, l'impact de l'utilisation du REBOA sur l'autorégulation vasculaire cérébrale et sa microcirculation reste pour l'instant totalement inconnu. Ces éléments sont pourtant des déterminants essentiels, afin de déterminer si le REBOA peut également permettre de protéger le cerveau dans cette situation. Nous comparerons ainsi trois conditions expérimentales : la première est celle d'une réanimation à l'aide du REBOA, la seconde est une réanimation de référence sans REBOA et avec administration d'adrénaline (Témoin), et la troisième est un refroidissement corporel ultra-rapide pendant la réanimation, en tant qu'approche neuroprotectrice de référence.

Dans cette étude, notre objectif est donc d'évaluer les variations de débit sanguin cérébral après occlusion de l'aorte par le REBOA pendant la réanimation cardio-pulmonaire chez le porc.

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 70 animaux. En considérant un pourcentage de réanimation avec succès d'environ 30 % dans le groupe adrénaline, cela permettra de montrer une augmentation d'au moins 50% du nombre d'animaux réanimés avec le REBOA et/ou l'hypothermie. L'ensemble des expériences sera réalisé à l'état anesthésié avec une administration d'antalgique, pour prévenir toute souffrance de l'animal (Raffinement). Ce travail se justifie par des applications potentielles rapides chez l'homme en cas de bénéfice pré-clinique.

17244 Notre projet vise à quantifier l'efficacité thérapeutique de molécules fournies par nos clients et radiomarquées avec différents isotopes (Lutetium-177, Actinium-225, Astate-211, Cuivre-67, Yttrium-90, Iode-131) pour le traitement de différents modèles tumoraux greffés chez la souris en sous cutanée: évaluation du retard de croissance tumorale ou de la régression tumorale.

Les souris recevront donc une greffe tumorale sous cutanée au niveau du flanc. La prise tumorale sera suivie tous les 2 jours par la mesure de la taille de la tumeur. Les traitements pourront se faire par les voies d'administration suivantes à savoir, sous-cutanée, intra péritonéale ou intra-veineuse à différents temps par rapport à l'inoculation des cellules en fonction du temps d'action de la molécule thérapeutique testée et de la demande du client. Le traitement pourra également être fait en une seule injection ou être répété à différents temps.

Des prélèvements sanguins après l'administration du traitement pourront être effectués afin d'évaluer l'élimination du produit du compartiment sanguin.

L'ensemble de ces expérimentations *in vivo* respecte la règle des 3R, comme mentionnée dans la directive européenne 2010/63/UE. En effet, les procédures utilisées ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives *in vitro* n'impliquant pas des animaux vivants car les processus tumoraux et thérapeutiques sont des processus intégrés nécessitant les interactions de nombreux organes. Le nombre minimal de souris par groupe sera utilisé en fonction des données préalables obtenues sur les types de tumeurs greffées et la connaissance de la molécule.

Le respect du bien-être animal passe par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi quotidien des animaux, des méthodes utilisées visant à réduire le plus possible toute forme de douleur, souffrance ou stress de l'animal ainsi que l'instauration de points limites pertinents et précoces.

Enfin, les milieux d'hébergement sont enrichis avec du papier accordéon pour faciliter la nidation et des tunnels.

Le nombre total maximum de souris utilisé au cours de ce projet sera au maximum de 2160 souris au cours des 5 années.

17245 Les néoplasies myéloïdes représentent des cancers du sang fréquent dont les mécanismes d'invasion du sang et de la moelle osseuse par les cellules tumorales sont relativement mal connus et pour lesquelles les thérapeutiques sont assez peu efficaces. Il s'agit de pathologies relativement bénignes initialement et durant d'assez longues périodes chez l'homme mais pouvant se transformer en pathologies beaucoup plus agressives entraînant la mort des patients en quelques semaines.

Afin de développer des stratégies thérapeutiques innovantes et plus efficaces, il est nécessaire de mieux comprendre comment les anomalies observées impactent le développement du cancer et ainsi mieux caractériser les mécanismes d'action de médicaments déjà utilisés en clinique. Les objectifs du projet sont donc de mieux comprendre la physiopathologie des néoplasies myéloïdes et de développer des tests pré-cliniques permettant de valider l'intérêt potentiel et le mode d'action de thérapies déjà utilisées mais également de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes plus performantes.

Pour mener à bien ce projet, nous développerons un modèle expérimental consistant à implanter en sous-cutané des éponges chirurgicales composées de différents types de cellules humaines, cellules sanguines et cellules du microenvironnement (=ossicules) à des souris dépourvues de système immunitaire, évitant ainsi le rejet de greffe. Après une étape de validation du modèle, nous testerons différentes drogues afin de caractériser leur effet sur le développement de la tumeur et leur mode d'action précis.

Les ossicules seront cultivés *in vitro* au préalable. La greffe en sous-cutanée sera réalisée sous anesthésie générale et avec une analgésie préalable à la chirurgie et consistera en maximum 6 incisions de 0,5 cm au niveau du dos de la souris, permettant la mise en place des ossicules. Différents types de traitements, déjà utilisés en clinique, seront administrés par voie intraveineuse, sous cutanée ou par gavage (sonde souple). Ces administrations seront réalisées sur souris éveillées sur une période de 1 à 3 mois après la greffe des ossicules. Ces techniques d'administration sont non douloureuses et ne nécessitent pas d'anesthésie ni d'analgésie. Des prélèvements sanguins réguliers (1 fois par mois sur animal non anesthésié pendant 3 mois) seront effectués à la veine mandibulaire (localisée au niveau de la joue) afin de s'assurer que les cellules humaines implantées restent confinées au sein de l'ossicule.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement). 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. Nous avons réduit au maximum le nombre de souris utilisés (15 souris par groupe) permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons au maximum 1320 souris sur les 5 ans que durera le projet. 60 souris immunodéficientes seront utilisées pour la mise en place du modèle (15 souris par groupe et 4 sources différentes de cellules humaines normales ou issues de patients atteints de néoplasies myéloprolifératives). Puis nous testerons l'effet de 10 drogues sur ce modèle, drogues administrées par voie intraveineuse, sous-cutanée ou par gavage sur animal vigile. Nous aurons ainsi 21 groupes de 15 souris (1 groupe contrôle, 10 drogues à 2 doses différentes) pour chaque modèle de greffe d'ossicules (4 sources différentes de cellules humainesensemencées dans les ossicules) soit 1260 souris immunodéficientes. Nous attacherons une grande importance au bien-être des animaux inclus dans ce projet. Les expériences de chirurgie (implantation sous-cutanée des ossicules) seront réalisées sous anesthésie générale et avec une analgésie pré- et post-opératoire. Afin de maintenir la température corporelle des souris anesthésiées, l'implantation des ossicules sera

réalisée sur un tapis chauffant et les souris seront ensuite placées sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil. Un contrôle deux fois par jour pendant la première semaine sera réalisé afin de s'assurer que les sutures ne s'ouvrent pas. Le relevé du score clinique sera réalisé une fois par semaine. Nous nous attacherons à surveiller l'apparence, la réaction à la manipulation et la perte de poids permettant ainsi de définir des points limites précoces, qui lorsqu'ils seront atteints conduiront à l'euthanasie de la souris. L'ensemble des souris sera euthanasié au plus tard 24 semaines après le début de la procédure.

17246 Le mélanome cutané est la forme de cancer de la peau la plus agressive. Il représente plus de 80% des décès liés au cancer de la peau et son incidence double tous les dix ans. Les formes les plus agressives de mélanomes sont souvent résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie conventionnelle. Malgré des progrès significatifs ces dernières années grâce au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, certains mélanomes montrent toujours une résistance aux protocoles thérapeutiques couramment utilisés. C'est le cas d'un sous-groupe de mélanome muté pour la molécule KIT (molécule favorisant le cancer et responsable de la transmission des signaux cellulaires), dont le pronostic est particulièrement sombre. Il existe donc un réel besoin de nouvelles thérapies pour améliorer le pronostic chez les patients atteints de ce type de cancer.

Pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, notre projet se concentre sur l'étude de molécules présentes dans les cellules tumorales et ayant déjà été décrites jouant un rôle majeur dans le développement des mélanomes mutés pour la molécule KIT. Le but final du projet, qui se divise en deux axes, est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, et de tester *in vivo* l'efficacité d'inhibiteurs de ces nouvelles cibles.

Tout d'abord, nous injecterons sous la peau de souris (injection non douloureuse sur souris éveillées) des cellules dérivées de mélanomes humains. Ces souris seront dépourvues de système immunitaire afin qu'il n'y ait pas de rejet des cellules humaines injectées. Dans ce modèle pré-clinique, nous testerons de 4 nouvelles molécules thérapeutiques ayant donné des résultats prometteurs *in vitro*. Les traitements auront lieu par voie orale, 3 fois par semaine, pendant 3 semaines au maximum. L'injection des cellules tumorales et l'administration des traitements n'entraîneront pas de douleur et par conséquent ne nécessiteront pas d'anesthésie préalable des souris. L'efficacité des stratégies thérapeutiques utilisées sera évaluée par la mesure de la taille de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse (mesure faite tous les 2 à 3 jours sur souris éveillée).

Pour le second axe, nous injecterons des cellules dérivées de mélanomes murins sous la peau de souris ayant un système immunitaire normal. Dans cette partie du projet, nous traiterons les souris avec de nouvelles molécules thérapeutiques (les mêmes que dans l'axe 1) en combinaison avec des thérapies visant à stimuler le système immunitaire et qui sont déjà utilisées en clinique afin d'accroître son efficacité dans la destruction des cellules tumorales.

Les souris seront suivies quotidiennement pour vérifier leur bien-être, en s'appuyant d'une grille d'évaluation clinique (grille prenant en compte le comportement, l'aspect physique, le poids et la taille de la tumeur). En cas d'atteinte d'un point limite, l'animal sera euthanasié.

Notre projet s'inscrit dans les recommandations de la règle des 3R. Remplacement : Nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro* afin de valider l'efficacité de nos molécules thérapeutiques. Néanmoins, il est nécessaire de vérifier ces résultats dans un modèle *in vivo* intégrant la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine telles que l'hétérogénéité des cellules tumorales, l'existence de tissus sains, la présence de barrières limitant l'efficacité des traitements. De plus cette étude est un préalable indispensable à toute utilisation en médecine humaine. Réduction : 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. Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 522 souris, sur une durée de 5 ans (dont 270 souris immunodéficientes et 252 souris immunocompétentes). Raffinement : 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. Nous avons ainsi défini des critères d'arrêt qui lorsqu'ils sont atteints conduisent à l'euthanasie de la souris.

Le suivi des souris en expérimentation se fera sur une période maximale de 3 semaines après le début du traitement, à l'issue de laquelle tous les animaux seront euthanasiés.

17247 Le lactate, produit de la dégradation du glucose lors de la glycolyse, a longtemps été considéré comme un déchet du métabolisme cérébral. Cependant, depuis une vingtaine d'année, ce dogme est remis en cause. En particulier, l'idée a progressivement émergé que la compartimentation cérébrale du lactate, c'est-à-dire sa distribution entre différents types cellulaires (neurones, astrocytes) et l'espace extracellulaire, joue un rôle fondamental pour la neurotransmission et la plasticité cérébrale. Des dérèglements du métabolisme du lactate, probablement liés à sa compartimentation, ont également été rapportés dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Pourtant, ces notions de compartimentation du lactate dans le cerveau restent mal comprises et débattues. Ceci est largement dû à l'absence d'outils pour l'évaluer de manière non-invasive.

L'objectif de notre projet est de développer de nouvelles méthodes *in vivo* de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), pour quantifier la compartimentation du lactate dans le cerveau de manière non-invasive. Des méthodes RMN *in vivo* couplées à des approches de modélisation seront développées afin de quantifier la fraction de lactate dans les neurones, les astrocytes et le milieu extracellulaire. Ces méthodes seront ensuite validées dans des modèles murins (souris) où la compartimentation du lactate est supposée changer par rapport à des souris contrôle (avec par exemple une quantité plus importante de lactate dans le milieu extracellulaire). Ces modèles incluront un modèle de stimulation cérébrale (via la stimulation des moustaches), un modèle de neuroinflammation et un modèle de maladie d'Alzheimer. Les fractions de lactate seront estimées de manière non-invasive par RMN *in vivo*, puis comparées à des mesures invasives effectuées par fluorescence FRET (Förster Resonance Energy Transfer) pour le lactate neuronal et astrocytaire, et par électrodes enzymatiques pour le lactate extracellulaire.

L'objet de la présente saisine est de mettre au point les méthodes de références (FRET et électrodes enzymatiques), et d'effectuer une première comparaison de ces méthodes avec des mesures RMN *in vivo* chez des souris où les niveaux de lactate seront modulés de manière transitoire. L'ensemble des procédures nécessitera 95 souris, ce qui constitue le minimum nécessaire afin de mener à bien les développements avec une précision suffisante (de 5 à 15 animaux par groupe, selon les techniques de mesure utilisées).

Le recours à l'animal est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité des cellules du cerveau, en particulier les interactions métaboliques de ces cellules. Les modèles rongeurs sont pertinents car ils peuvent être observés *in vivo* par des scanner IRM à haute performance et ce, malgré la petite taille des cerveaux murins. Chez certaines souris, une fibre optique ou une électrode sera implantée pour la mesure du lactate. Les autres souris seront examinées par RMN. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin de l'étude. Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie générale et avec application locale d'analgésique afin d'éviter tout stress ou douleur liés à la chirurgie ou au système de positionnement de l'animal qui diminuerait son bien-être. Un suivi quotidien est assuré pour surveiller l'apparition de problèmes de santé. Des critères d'arrêt sont mis en place afin d'éviter toute dégradation importante de leur bien-être.

17248 La régulation du métabolisme énergétique cardiaque est un élément clé du bon fonctionnement du corps humain dont certains aspects sont encore imparfaitement compris. Il est établi aujourd'hui que les risques de développer une pathologie cardiovasculaire sont augmentés en cas de maladies métaboliques comme l'obésité, le diabète, et/ou l'hypertension. Des données récentes ont montré un lien indirect entre le développement d'une stéatose hépatique non alcoolique (NASH) et des pathologies cardiovasculaires, sans que les mécanismes sous-jacents ne soient décrits. Ces mécanismes complexes de communication inter-organes foie-cœur seront étudiés à travers ce projet dans un modèle murin. Grâce à l'exposition à deux régimes hypercaloriques, nous caractériserons le phénotype cardiaque. Nous évaluerons le remodelage et l'hypertrophie cardiaque par différentes méthodes non invasives tels que l'électrocardiogramme ou l'imagerie par résonance magnétique, mais également par des études invasives comme l'histologie ; les propriétés de contraction par des

expérimentations sur cœur isolé perfusé de Langendorff (étude *ex vivo*), et nous déterminerons la susceptibilité à la fibrillation cardiaque par stimulations électriques des oreillettes et ventricules.

« Remplacer » : La physiologie du cœur de souris est similaire à celle de l'humain, tout comme le développement de maladie chronique du foie et ne peut malheureusement pas être remplacée par des techniques de substitution.

« Réduire » : Le projet a été conçu avec un nombre minimal d'animaux nécessaire pour assurer sa validité scientifique et statistique. Nous avons constitué des groupes d'analyse de 5 à 8 souris pour chaque sous-type d'analyses (ex : ARN/protéines ; cytométrie...) en fonction des données de la littérature et de nos expériences passées au laboratoire. Nous travaillerons avec des souris génétiques modifiées et leurs souris contrôles littermates (n=8400 souris maximum). La difficulté des expérimentations sur le cœur de souris est que la plupart des analyses biologiques nécessite un cœur entier (poids total environ 150-200 mg), homogénéisé en lysat ou broyat afin d'obtenir une quantité de matériel biologique suffisante. C'est le cas pour la cytométrie, l'activité mitochondriale et les expressions géniques ou protéiques (que nous essaierons tout de même de réaliser sur le même échantillon de cœur). L'utilisation du cœur isolé perfusé évite les stimulations répétées chez la souris vivante mais l'analyse nécessite un savoir-faire et une précision extrême que nous maîtrisons dans notre équipe spécialisée dans l'analyse cardiaque néanmoins, nous estimons qu'un groupe de 8 souris minimum est requis. Enfin, nous réduisons à 6 le nombre de souris pour les groupes de stimulation atriale transoesophagienne ou stimulation ventriculaire. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous procéderons à des analyses histologiques sur ces cœurs stimulés. Les procédures pas ou peu invasives se feront de manière successive en respectant un temps de récupération d'au moins une semaine entre l'IPGTT, la mesure de la pression artérielle, l'ECG...

« Raffiner » : Les différentes lignées utilisées dans nos procédures ne présentent aucun problème physique ou physiologique. L'ensemble des expérimentations est mené par du personnel qualifié et formé afin d'éviter tout stress ou inconfort de l'animal avec une attention particulière sur la gestion de la douleur. Néanmoins, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être animal en observant les paramètres cliniques suivants, définissant les points limites:

- perte de poids de 15% ou plus (et le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) :
- apparence physique externe (piloérection, dos rond, signes d'infection, respiration anormale...)
- changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale)
- réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront sacrifiés par dislocation cervicale après anesthésie par kétamine/xylazine dans une salle dédiée. Ce suivi sera réalisé en lien avec le responsable du bien-être animal.

17249 L'option thérapeutique de choix pour le traitement des tumeurs broncho-pulmonaires de stade précoce est la chirurgie. Cependant, environ 20 à 30% des patients sont à haut risque chirurgical, et le traitement en radiothérapie conventionnelle n'a qu'une efficacité limitée sur la tumeur. La radiothérapie en conditions stéréotaxiques consiste à irradier de très petits volumes grâce à la convergence de mini-faisceaux et avec une précision balistique très importante, inférieure à 1 mm. Cette option thérapeutique a depuis 10 ans grandement amélioré la prise en charge thérapeutique des patients inopérables atteints de cancer broncho-pulmonaire de stade précoce. La réduction du volume d'irradiation autorise l'utilisation de protocoles d'irradiation plus agressifs avec de très fortes doses par fraction (hypofractionnement sévère, de 6 à 20 Gy par fraction au lieu de 2 Gy en fractionnement conventionnel) et assure un bon contrôle tumoral. Cependant, et malgré la précision balistique, certains patients développent des effets secondaires pulmonaires (pneumopathie radique de type inflammatoire ou fibreux).

Irradier de très petits volumes chez la souris n'est possible que depuis quelques années grâce à la commercialisation d'outils capables de générer des mini-faisceaux de l'ordre d'un à quelques millimètres. Depuis 4 ans au laboratoire, nous travaillons sur un modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris (P15-03 et P17-13). Nous avons acquis un recul important sur les effets

cliniques et anatomopathologiques de la dose totale reçue et du volume pulmonaire irradié. En particulier, nous avons mis en évidence une augmentation massive du nombre de macrophages au niveau du site lésionnel et souhaitons poursuivre les projets sur le rôle de ces nombreux macrophages dans le développement des lésions pulmonaires. Les monocytes (précurseurs des macrophages) sont recrutés depuis la circulation sanguine via le récepteur CCR2 (C-C chemokine receptor type 2). Plusieurs travaux ont démontré que les souris déficientes en CCR2 (souris CCR2^{-/-}) sont protégées de la fibrose pulmonaire dans plusieurs modèles, suggérant un rôle majeur des macrophages dans le développement de la fibrose pulmonaire. Le but de ce projet est d'utiliser des souris CCR2^{-/-} comparée à des souris sauvages pour évaluer le rôle des macrophages dans le développement des lésions pulmonaires aiguës et tardives suite à une irradiation stéréotaxique.

La lésion tissulaire sera réalisée grâce à une irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris, avec un irradiateur disponible sur le site piloté par une physicienne. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques et modèle déficient en CCR2. Compte-tenu de l'étude d'un phénomène à l'échelle d'un organisme dans son ensemble, un modèle *in vitro* ne permettrait pas de répondre aux questions posées par le projet.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 580.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables.

Les analyses se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal après son euthanasie. Les procédures d'irradiation seront réalisées sous anesthésie et les animaux seront surveillés avec attention pendant toute la durée du projet.

17250 L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est associée à une morbi-mortalité majeure chez l'homme. Elle peut également entraîner le développement ultérieur d'une insuffisance rénale chronique, qui pourra évoluer vers l'insuffisance rénale terminale. L'ischémie/reperfusion rénale (I/R) est la plus fréquente cause intrinsèque d'IRA. Elle se caractérise par des lésions tubulaires et vasculaires rénales liées à un stress oxydatif majeur et une inflammation locale aseptique. En transplantation rénale, l'I/R est inévitable puisque le greffon du donneur prélevé subit, avant réimplantation chez le receveur, une ischémie de quelques dizaines de minutes (en cas de greffe donneur vivant), à plus de 24 heures, en cas de donneur décédé. A court terme, elle est le principal responsable d'un retard de reprise de fonction du greffon. Elle est aussi source d'une fibrose accélérée du rein, faisant le lit de la dysfonction chronique du greffon et est associée à la survie du patient. L'enjeu de la prise en charge de l'IRA et de l'I/R du greffon est majeur dans le département où nous effectuons notre étude. L'incidence annuelle de l'insuffisance rénale terminale y est la plus élevée de France, et présente, par son éloignement géographique, les délais d'ischémie du greffon les plus élevés de France. Actuellement, les options thérapeutiques sont essentiellement conservatrices : Il n'existe aucun traitement spécifique ciblant la prévention des lésions d'I/R sur reins natifs ou du greffon, ni de molécule antifibrosante dans le cadre de la maladie rénale chronique.

Dans le cadre de l'axe « thérapies innovantes » de notre laboratoire, notre équipe s'intéresse particulièrement aux propriétés de l'HDL (High Density Lipoprotein) thérapie et de certaines plantes provenant de la biodiversité locale. Plusieurs travaux, *in vitro* et *in vivo*, montrent les effets anti-inflammatoires et antioxydants des polyphénols présents dans la plante médicinale "Antirhea borbonica", en particulier de l'acide caféique qui est le polyphénol majeur de cette plante. Les HDL étant des molécules de transport, il est possible de les enrichir avec ces principes actifs issus de ces plantes, comme nous l'avons déjà réalisé pour des molécules d'HDL enrichies avec de la curcumine. L'acide caféique étant peu hydrosoluble, le vecteur HDL pourrait permettre une amélioration de sa distribution dans les zones lésionnelles d'intérêts. Ainsi, l'association des propriétés des HDL avec celles des molécules actives issues des plantes pourrait avoir un potentiel néphroprotecteur majeur dans ce contexte d'I/R rénale. Afin de mimer au plus près la pathologie humaine, nous utiliserons un modèle d'I/R chez la souris qui subiront un clamping vasculaire bilatéral. Ce modèle est classiquement utilisé pour recréer l'IRA liée à l'I/R.

De plus, il permet une transition vers l'insuffisance rénale chronique avec développement d'une fibrose. Notre but est d'évaluer les effets locaux (rénaux) mais également systémiques (hépatique) des lésions aiguës d'I/R et le développement d'une fibrose rénale à distance. Le modèle d'I/R unilatéral ne permet pas l'exposition systémique aux toxines urémiques (puisque le rein controlatéral compense). De plus, sur le plan de la généralisation des résultats, le modèle bilatéral se rapproche beaucoup plus de la physiologie humaine, où les processus pathogènes touchent également les 2 reins.

Nous étudierons la distribution tissulaire des HDL, de l'acide caféique et des HDL enrichis en acide caféique après survenue d'une I/R afin de rechercher une distribution préférentielle dans les zones lésionnelles. Nous évaluerons l'effet de l'administration d'HDL recombinante, d'acide caféique et d'HDL recombinante enrichie en acide caféique sur les lésions d'I/R rénales et hépatiques en aiguë, et sur la progression de l'insuffisance rénale au niveau fonctionnel et tissulaire. Les résultats que nous obtiendrons pourront justifier l'étude des propriétés bénéfiques des HDL, des extraits ou des HDL enrichis dans les modèles de greffe rénale.

Pour ce projet nous avons fixé un plafond de 102 souris. Nous serons particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux vivants est indispensable car l'I/R rénale est impossible à reproduire sur des modèles *in vitro* simplifiés. En effet nous avons besoin de toute la complexité vasculaire et inflammatoire d'un organisme vivant pour mimer la pathologie humaine. Les études sont systématiquement optimisées d'après la littérature et/ou les observations réalisées au laboratoire (micro-chirurgie, doses injectées, durée du traitement). De plus les traitements seront administrés de la façon la moins invasive possible (Injection intrapéritonéale ou gavage).

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, les expériences sont planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter de programmer des séries inutiles. De plus, les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (microchirurgie, mode et volume d'injection, administration d'anti-douleur avant et après chirurgie, durée du traitement). Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons est extrait de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel biologique.

Raffinement : l'application de la politique de réduction mise en place permet d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer d'un minimum d'animal un maximum d'information. De plus, la formation des personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir dans des conditions appropriées (temps de formation respecté) permet de réaliser nos expérimentations animales dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Tous les animaux sont hébergés dans un service de zootechnie ayant un environnement enrichi qui a été agréé par le ministère. Afin de raffiner le protocole initial, la procédure d'anesthésie fixe a été remplacée par une anesthésie volatile (moins contraignante pour les animaux).

17251 L'athérosclérose est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Cette maladie est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires. Elle se caractérise par une accumulation de cholestérol et de cellules inflammatoires dans la paroi des vaisseaux (endothélium) qui gêne le fonctionnement du cœur et conduit à la "crise cardiaque" ou aux accidents vasculaires cérébraux (AVC). La formation des plaques d'athérosclérose débute dès l'enfance et leur progression dépendra majoritairement de facteurs de risque identifiés tels que le diabète, l'hypertension, les dyslipidémies et le tabagisme ainsi que des facteurs génétiques et environnementaux. A l'heure actuelle, aucun traitement thérapeutique ne vise la formation et la progression de ces plaques. Nous savons également qu'une molécule, composée de 4 acides-aminés, a la capacité d'inhiber le recrutement des cellules de l'inflammation lors de l'activation de la paroi vasculaire, phénomène qui est à l'origine de la formation de plaque d'athérosclérose. Le but de ce projet est donc de tester cette molécule dans un modèle murin d'athérosclérose afin d'évaluer si elle est capable de diminuer la progression de la plaque d'athérosclérose. Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées qui sont décrites comme modèles murins d'athérosclérose, des souris déficientes en gène de l'apolipoprotéine E, capable de générer des plaques d'athérosclérose au niveau des zones de courbures artérielles, comme l'aorte ou

les bifurcations. La règle des 3R sera respectée : Réduction : Le nombre de souris a été réduit au minimum, soit un total de 24 souris, pour permettre une bonne évaluation statistique d'une thérapie par cette molécule entre deux groupes indépendants sur le développement de l'athérosclérose (test Mann-Whitney). Remplacement : Seule une étude *in vivo*, c'est-à-dire incluant la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu lors du développement de maladies inflammatoires et métaboliques, peut permettre d'atteindre l'objectif de ce projet. Aucune méthode de remplacement ne peut donc être employée. Raffinement : Les animaux ne subiront que très peu de contraintes et la douleur sera minimisée. Les cages seront enrichies (coton). De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal de la naissance à la mort grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agirons en conséquences. Les pompes seront mises en place sous anesthésie générale de l'animal avec gaz halogéné, incluant une pré et post-médication anti-inflammatoire et un anesthésique local. Les souris seront surveillées quotidiennement. Dans le cas de toute modification physique ou comportementale, la surveillance sera accentuée et les souris seront soignées et/ou placées sous antidouleurs afin de minimiser toute souffrance, détresse ou inconfort. Enfin, si l'animal ne parvenait pas à se rétablir, la mise à mort sera obligatoire. La fin du protocole prévoit un prélèvement de sang total intracardiaque, après anesthésie générale de la souris par isoflurane. La mise à mort se fera par dislocation cervicale.

17252 Le projet initial incluant cinq procédures expérimentales a été autorisé pour une durée de 3 ans en 2019. Après 18 mois d'expérimentation, en vue des résultats obtenus, il y a besoin dans la progression du projet d'ajouter deux nouvelles procédures expérimentales (N°6 et 7) qui nous permettront d'évaluer la protection par les antidotes de l'effet neurotoxique des organophosphorés de façon distincte dans le système nerveux central et périphérique. Les organophosphorés (OPs) constituent une famille de molécules utilisées comme pesticides en agriculture et peuvent également être des armes chimiques. Les séquelles d'une intoxication à ces composés sont graves, notamment neurologiques, pouvant conduire à la mort. On compte environ 25 000 cas mortels et 3 millions de cas d'intoxications sévères par an au niveau mondial. En cas d'empoisonnement par un OP, le traitement conventionnel médical d'urgence administré demeure relativement efficace pour traiter les effets à court terme sur les neurones mais inefficace pour les effets sur le système nerveux central du fait d'une capacité très limitée de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière physiologique est un filtre très sélectif de la circulation sanguine qui protège le cerveau des agents pathogènes et de certaines molécules toxiques. C'est dans ce contexte de problème de santé publique que nous avons proposé dans ce projet de développer un modèle animal alternatif pour comprendre le mode d'action de ces composés et pour identifier de nouveaux antidotes efficaces pour lutter contre les effets délétères de ces molécules toxiques. La découverte de nouveaux médicaments peut nécessiter l'utilisation d'un modèle animal pour la modélisation de la pathologie inducible par l'exposition à des molécules toxiques et pour l'identification et la validation dans un modèle *in vivo* complexe d'antidotes nouveaux à proposer pour des études cliniques. La larve du poisson zèbre âgée de sept jours après la fécondation (jaf) est le modèle retenu pour notre projet. A ce stade de développement, la BHE est mise en place et les fonctions biologiques ainsi que les acteurs moléculaires qui sont ciblés par les OPs dans l'espèce humaine sont conservés chez le poisson zèbre. Ce modèle possède de nombreux avantages, comme par exemple un élevage peu onéreux et facile, la petite taille des larves et un suivi individuel possible d'un grand nombre d'animaux simultanément pour des tests locomoteurs.

D'un point de vue expérimental notre projet consiste à tester, à l'aide de différents tests biochimiques, locomoteurs et comportementaux, les effets d'OPs seuls ou en combinaisons avec un antidote/molécule pharmacologique ou un cocktail d'antidotes. Dans cette demande d'avenant deux nouvelles procédures expérimentales ont été ajoutées au projet OP-REACT initial. En effet, suite aux développements de nouvelles techniques, une meilleure évaluation des antidotes est possible avec l'étude du passage de la BHE qui représente un problème majeur dans le traitement des effets neurologiques. Le projet, d'une durée de trois ans, incluait initialement au maximum 30 expérimentations par an comptant en moyenne 600 larves, soit un total maximal de 54 000 larves sur l'ensemble du projet. Après 18 mois, 40 expérimentations ont eu lieu et 22 770 larves ont été déclarées. Nous estimons à environ 34 le nombre d'expériences restantes avec en moyenne 820 larves, soit moins de 29 240 larves jusqu'à la fin du projet. Le nombre total, avec l'ajout des deux nouvelles procédures

reste donc en dessous des 54 000 larves prévues initialement sur les 3 années du projet avec au maximum 52 000 animaux utilisés. Au final, pour chaque condition d'exposition, entre 119 à 124 larves sont nécessaires pour effectuer tous les différents tests décrits dans les procédures expérimentales qui permettent d'évaluer l'efficacité des antidotes : 6 larves sont utilisées pour la détermination du phénotype locomoteur par la réponse motrice visuelle ; entre 10 à 15 larves pour la détermination du phénotype locomoteur par la réponse motrice induite par stimulation électrique ; 6 larves pour la caractérisation de l'effet anxiolytique ; 51 plus 36 larves pour les tests enzymatiques (« larve entière » et « tête/tronc ») et 10 larves pour les imageries microscopiques. Dans le cas de la mesure de l'anxiété, les larves enrôlées dans l'étude du phénotype locomoteur seront également utilisées pour effectuer une évaluation de l'anxiété minimisant ainsi le nombre d'animaux utilisés pour le projet de recherche. (3R : Réduction)

Les procédures expérimentales mises en œuvre s'effectueront au plus proche des conditions physiologiques de vie de l'animal avec des enceintes et des pièces thermostatées à 28°C et dans une eau dont les paramètres physico-chimiques sont contrôlés. De plus, le nombre de larves par exposition est restreint et adapté au volume d'eau afin de limiter le stress des larves. (3R : Raffinement).

A la fin de l'expérimentation, les larves contaminées par les molécules toxiques et ayant été enrôlées dans les tests locomoteurs et comportementaux seront euthanasiées par sédation profonde puis congélation. Les analyses biochimiques seront réalisées sur animaux après congélation instantanée dans l'azote liquide (-195°C) ou après décapitation. Les marquages in situ seront réalisés sur des larves fixées au paraformaldéhyde anesthésiées dans le froid. Les animaux contrôles seront conservés afin d'augmenter le nombre d'animaux en élevage pour la reproduction au sein dans notre animalerie agréée. Dans nos procédures, le respect de la règle des 3R est également mis en œuvre par la réduction du nombre d'animaux utilisés pour les tests locomoteurs et comportementaux du fait du suivi individuel de l'animal. Ceci engendre un grand nombre de données individuelles permettant de limiter le nombre de répliques des expérimentations grâce à une statistique utilisant l'appariement des données. (3R : Réduction)

Certaines des molécules utilisées dans nos travaux peuvent avoir été déjà approuvées par l'Agence Européenne des Médicaments (AEM). S'il s'agit d'un repositionnement thérapeutique, ces molécules peuvent donc être enrôlées dans des essais cliniques sans être à nouveau validées sur un modèle mammifère. La larve de poisson-zèbre peut alors être considérée comme un accélérateur de découverte d'antidotes sans nécessité d'utiliser l'expérimentation animale sur mammifères. (3R : Remplacement).

17253 L'obésité est fréquemment associée à un ensemble de complications métaboliques augmentant le risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires. En outre, l'obésité représente également un facteur de risque pour le développement de nombreuses autres pathologies, parmi lesquelles les infections pulmonaires d'origine virale ou bactérienne. S'il est admis que l'infection par le virus de la grippe est plus sévère chez les individus obèses, les données concernant l'infection par la bactérie *Streptococcus pneumoniae* - l'une des principales causes de pneumonies et de méningites chez l'Homme - sont peu nombreuses et contradictoires.

L'objectif du projet est de caractériser l'infection par *S. pneumoniae* (sérotypage 1) chez des souris (C57Bl/6, mâles) rendues obèses par la consommation d'une alimentation riche en graisses (régime high-fat diet, 60% kcal provenant de graisses). Il s'agit d'une étude originale qui n'est donc pas la répétition des études antérieures qui utilisaient des modèles d'obésité d'origine génétique, plus rares chez l'Homme.

Le projet mettra en œuvre deux procédures expérimentales ayant déjà été approuvées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour d'autres projets de notre équipe : induction de l'obésité par consommation d'un régime obésogène, et infection par *S. pneumoniae*. Aucun changement ne sera apporté à ces procédures dans le présent projet. Une troisième procédure expérimentale sera également utilisée : perfusion intracardiaque d'une solution saline, indispensable pour les analyses histologiques des tissus.

Lors de la conception du projet, nous avons cherché à respecter la règle des 3R : i) « Réduction » du nombre d'animaux en expérimentation ; seules les expériences qui ne peuvent être remplacées par des méthodes alternatives seront réalisées, les données expérimentales obtenues au décours des expériences seront exploitées au maximum, et le nombre d'animaux a été estimé en fonction de nos données préalables pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. ii) « Raffinement » des procédures ; les conditions d'hébergement et de manipulation des animaux seront en faveur du bien-être animal. 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 et/ou souffrance. Durant toute la durée des procédures, la souffrance sera évaluée par un suivi quotidien de l'attitude corporelle, de l'aspect du pelage, et du poids corporel de sorte à éventuellement utiliser un traitement antalgique ou à sortir un animal de l'étude en cas d'atteinte des points limites définis (Points limites: perte de poids >15%, détérioration irréversible de l'état de l'animal impactant sa survie (pertes d'alimentation et de consommation hydrique brutales, perte de poids supérieure à 15%, tremblements, convulsions, boiteries, décubitus permanent, difficultés respiratoires, prostration, vocalisation, plaie). iii) « Remplacement » ; L'objectif du projet est de comparer les conséquences de l'infection par *S. pneumoniae* chez les souris obèses et normopondérales. Aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est envisageable.

Sur la période de 3 ans, 1320 souris seront nécessaires pour atteindre nos objectifs.

17254 Ce projet a pour objectif d'étudier les conséquences d'un syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) sur les fonctions cognitives. Pour cela, les effets isolés et conjoints d'une insuffisance respiratoire intermittente (hypoxie chronique intermittente, HCl) ainsi qu'une fragmentation du sommeil (FS), sur l'apprentissage et la mémorisation spatiale chez un modèle animal non anesthésié (rat) seront évalués, de même que le niveau de stress au niveau cellulaire (stress oxydatif). D'après la littérature, l'HCl entraîne des altérations de la mémoire spatiale et consolidation de la mémoire, et la FS un niveau plus élevé d'anxiété pouvant nuire à l'apprentissage. Ces 2 éléments servent de base à notre hypothèse d'un lien entre SAOS et cognition. L'association d'HCl+FS n'a encore jamais été étudiée et pourrait amplifier les altérations cognitives. Dans l'étude, cet effet conjoint sera comparé aux effets isolés de chacune des interventions (HCl/FS) ainsi qu'aux résultats d'un groupe contrôle.

L'étude sera menée en conformité avec les exigences des 3 R.

Ce travail s'inscrit dans un cadre de recherche intégrée sur l'étude des mécanismes physiopathologiques des conséquences du SAOS. L'objectif principal est de préciser les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les troubles cognitifs du SAOS et de développer un modèle animal encore plus proche de la situation réaliste du SAOS chez l'homme en associant FS+HCl. Ne pouvant être réalisé chez l'homme il ne peut être fait que chez l'animal entier pour intégrer les interrelations entre les différents systèmes de régulations et fonctions ("Remplacer").

Le nombre d'animaux à étudier (n=40) a été établi de façon optimale ("Réduire"), correspondant à celui qui permet une significativité des résultats. 4 groupes de rats adultes seront étudiés:

-groupe "HCl" isolée (n=10);

-groupe "FS" isolée (n=10);

-groupe "HCl" ET "FS" (n=10);

-groupe contrôle (n=10).

Deux procédures seront appliquées :

1) Modèle de SAOS chez rat adulte (procédure expérimentale classe modérée): L'HCl sera réalisée par l'exposition des animaux à une diminution de 21 à 10 % de la fraction inspirée d'oxygène, pendant 90 sec, toutes les 90sec (phase « on » / « off »). Elle sera maintenue 12heures par jour durant 14 jours, puis 10h par jour pendant 4 jours pour permettre l'évaluation concomitante de l'apprentissage et de la mémorisation spatiale. FS sera réalisée par l'association d'une percussion mécanique des parois du compartiment hébergeant les animaux et d'un signal auditif selon le même calendrier que l'HCl.

2) L'évaluation de l'apprentissage sera réalisée par le test du Labyrinthe de Morris qui consiste à apprendre à chaque rat à localiser une plateforme immergée dans une piscine circulaire (procédure expérimentale classe modérée). Chaque rat aura 4 essais par séance d'entraînement (une séance par jour) pour trouver la plate-forme avec un intervalle de temps de 10 minutes entre chaque essai. Le rat aura un temps maximal de recherche de 120sec et lorsqu'il ne trouvera pas la cible dans le délai imparti il sera délicatement guidé ou déposé sur la plate-forme pour y rester au moins 30sec. Chaque essai sera enregistré par une caméra numérique installée au plafond et surplombant la piscine et les séquences seront analysées par un logiciel de localisation, repérage et suivi des trajectoires. Le dernier essai du quatrième jour sera remplacé par un test de rétention ("probe test") durant lequel la plate-forme est retirée et la mémorisation de l'orientation spatiale est évaluée formellement par mesure de la latence pour trouver une première fois l'endroit où se trouvait la plate-forme, le nombre de fois où il va y retourner, le temps cumulé passé à cet endroit et la distance nagée pour y parvenir. A côté de cette évaluation quantitative, une évaluation qualitative des parcours de recherche sera aussi réalisée puisqu'il est possible d'établir une classification de ceux-ci permettant une gradation de la mémorisation spatiale, depuis son absence totale à son acquisition complète.

A l'issue des études cognitives, l'animal sera mis à mort dans le respect des conditions éthiques pour prélèvement du tissu cérébral et son analyse ultérieure.

"Raffiner": En amont de l'expérimentation, les animaux sont hébergés dans l'animalerie où toutes les procédures en matière de confort et de minimisation du stress sont appliquées : acclimatation des animaux pendant 10 jours après réception, enrichissement du milieu lors de l'hébergement y compris pendant les périodes d'HCI et/ou FS. Les animaux seront en cycle veille-sommeil inversé pour que les procédures expérimentales impliquant l'HCI et/ou FS soient menées pendant la période de sommeil des animaux, et la procédure expérimentale impliquant l'apprentissage dans le labyrinthe de Morris pendant la période d'éveil (dans la journée pour l'expérimentateur, qui sera la nuit pour les animaux).

Suivi des animaux et Points limites (PL) : aucune souffrance ni douleur physique ni mortalité ne sont attendues dans ce type de modèle et de procédures. A chaque étape, une attention particulière sera prodiguée aux animaux avec surveillance quotidienne pendant les périodes de HCI ou FS ainsi que la surveillance toutes les 30 minutes pendant l'apprentissage dans le labyrinthe de Morris pour évaluer tout signe d'inconfort ou de stress.

Une grille de suivi quotidien de l'animal sera mise en place pour détecter rapidement la survenue des comportements pouvant indiquer un mal-être (grille ci-jointe). Plusieurs paramètres seront surveillés : poids, respiration, activité/mobilité, état du pelage et toilettage, aspect tête émacié/crispé (selon « rat grimace scale ») et posture inhabituelle.

PL graves conduisant directement à la mise à mort de l'animal dans des conditions éthiques (sédation par isoflurane puis décapitation par guillotine par du personnel expérimenté) seront:

- perte du poids 15-20% en 72heures
- respiration nécessitant une assistance
- « rat grimace scale » : score à 2

PL conduisant au retrait de l'environnement HCI et/ou FS par isolement en cage individuelle dans une pièce séparée des conditions HCI /FS, nursing avec alimentation plus appétente seront :

- perte du poids 5-15% en 72h
- « rat grimace scale » : score >1 et <2
- posture inhabituelle
- inactivité.

Une réévaluation sera réalisée à 48-72h; si pas d'amélioration, l'animal ne participera plus à l'étude et sera mis à mort dans des conditions éthiques.

17255 Ce projet de recherche adresse les mécanismes physiopathologiques des troubles du comportement alimentaire (TCA), un enjeu majeur de santé public. Ainsi, dans ce projet, nous développerons un protocole expérimental chez le rat pour étudier la sécrétion des neurotransmetteurs impliqués dans la régulation du comportement alimentaire. Notre hypothèse est que le microbiote intestinal et le système

immunitaire, connus pour être perturbés chez les malades TCA, peuvent interagir avec les voies moléculaires de la faim et la satiété. La sécrétion des neurotransmetteurs sera étudiée chez le rat male Wistar âgé de 2-3 mois par une technique de microdialyse intracérébrale. Ainsi, nous allons étudier si l'administration intraveineuse des peptides d'origine bactérienne ou des immunoglobulines plasmatiques réagissant avec des hormones de la faim et la satiété, pourrait altérer la sécrétion des neurotransmetteurs au cours de la prise alimentaire spontanée. Afin de réduire et raffiner l'utilisation des animaux, les guides de microdialyse pour 2 régions cérébrales seront implantés simultanément chez le même rat. L'opération sera effectuée par un chercheur expérimenté, sous analgésique et anesthésique pour limiter la douleur animale. Selon les méthodes statistiques, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum pour obtenir les résultats attendus. Le nombre total d'animaux est de 360. Un éventuel remplacement de cette approche expérimentale, qui réunit le comportement alimentaire avec plusieurs systèmes biologiques, est actuellement impossible.

17256 La Sclérose Latérale Amyotrophique ou SLA est la première maladie du motoneurone, 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. Certains patients atteints de SLA présentent également des démences qui se manifestent par des anomalies du comportement. 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.

Dans le système nerveux, les motoneurons sont enrobés d'une gaine, la myéline, qui permet une transmission plus rapide et plus efficace du signal. Chez les patients et plusieurs modèles murins de la maladie, il a été montré que les cellules chargées de former cette gaine de myéline sont altérées. Dans ce projet, nous voulons caractériser la capacité de remyélinisation de ces cellules après une altération de la myéline chez des souris portant la mutation FUS.

Pour cela nous proposons d'utiliser de la cuprizone sur notre modèle murin FUS. La cuprizone permet une démyélinisation réversible des neurones moteurs, c'est à dire que l'administration de cuprizone entrainera l'altération des gaines de myéline, mais l'arrêt du traitement et le retour à une nourriture normale permettra la reformation de cette gaine de myéline autour des motoneurons dans un délai de 6 semaines. La cuprizone est incorporée à la nourriture, ce qui n'est pas invasif pour l'animal. De plus, un traitement à la cuprizone n'entraîne pas de douleur ou d'inconfort chez l'animal : les symptômes moteur associés au traitement sont faibles.

Le but de ce projet est d'identifier plus précisément la nature de l'altération des cellules chargées de la formation de la gaine de myéline dans la SLA.

Remplacement : La SLA est une maladie trop complexe et impliquant trop de types cellulaires pour permettre un modèle *in vitro*, c'est pourquoi nous devons travailler sur des animaux. Cependant nos souris FUS présentent des symptômes moteurs et comportementaux très légers et aucun signe de souffrance n'a été identifié chez ces souris. De plus ces souris seront utilisées avant l'apparition des symptômes liés à la mutation FUS.

Réduction : 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 93 souris.

Raffinement : Des points limites ont été établis afin de limiter la souffrance des animaux utilisés qui bénéficieront de conditions d'hébergement conformes à la réglementation en vigueur. Des copeaux ainsi que des boules de coton seront fournies dans la cage pour raffiner l'environnement de l'animal. Les souris auront un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture.

17257 Les maladies neurodégénératives sont des maladies qui affectent le cerveau. Les plus connues sont la maladie d'Alzheimer ou Parkinson. Il en existe de nombreuses autres comme une maladie connue

sous le nom de Niemann-Pick qui est dû à l'accumulation de cholestérol dans les cellules du cerveau. Cette accumulation de cholestérol a également été montrée dans la maladie d'Alzheimer. Une protéine circulante appelée "Wnt5a" limite l'accumulation du cholestérol.

L'objet de ce projet est d'étudier les maladies neurodégénératives associées à l'accumulation de cholestérol et l'identification des mécanismes par lesquels Wnt5a contrôle le devenir du cholestérol dans les cellules du cerveau. Notre objectif étant de trouver des cibles thérapeutiques pour soigner ces maladies neurodégénératives. Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées dont les cellules cérébrales seront dépourvues de Wnt5a.

Tout d'abord nous caractériserons ce tout nouveau modèle animal afin de déterminer si la présence de Wnt5a dans les cellules du cerveau n'est pas primordiale pour le développement du système nerveux central et donc pour la survie de l'animal. Nous suivrons le nombre de naissance d'animaux Wnt5a KO, puis le devenir des animaux adultes pendant plusieurs mois. Nous confirmerons chez l'animal adulte, le rôle protecteur de Wnt5a en donnant à cette nouvelle lignée de souris (NestWnt5a) ainsi qu'aux souris témoins un régime riche en cholestérol pour accélérer la survenue de maladie neurodégénératives chez les souris Wnt5aKO.

Avec ce modèle nous pourrions étudier les mécanismes contrôlant l'accumulation du cholestérol dans les cellules du cerveau entier. Nous utiliserons 180 animaux au maximum sur 5 ans.

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 les maladies neurodégénératives. 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 neurones (lignée cellulaire) pour approfondir les résultats obtenus sur les animaux et étudier certains mécanismes liés à l'utilisation du cholestérol par ce type de cellules.

Réduction : Si nous arrivons à mettre en évidence un mécanisme d'action de Wnt5a rapidement, nous n'utiliserons pas le nombre total d'animaux demandé (180 animaux sur 5 ans au total).

Nous utiliserons également nos souris afin de faire des cultures de cellules cérébrales 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 (œdèmes dû à l'insuffisance cardiaque qui peut s'installer, prostration). Pendant la phase de régime, les animaux seront 3 à 5 dans des cages de 425 cm², 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.

17258 Les infections à *Clostridium difficile* sont la cause des maladies diarrhéiques. Cette bactérie est fortement associée à la maladie chez les patients avec un âge et une fragilité croissants, une immunodéficience et en particulier une modification du microbiote normal par l'utilisation d'antibiotiques. Les infections varient d'un portage asymptomatique à des infections légères à épisode unique, en passant par une maladie grave, récurrente et invalidante. La maladie est largement associée à la production de deux grandes toxines, la toxine A et la toxine B. La protection contre ces infections par les muqueuses gastro-intestinales est assurée par des taux élevés d'anticorps IgG circulants dans le sérum. C'est pourquoi nous visons à combiner un antigène hautement immunogène et un adjuvant puissant pour générer des niveaux élevés de réponses anticorps dans la semaine suivant la seconde immunisation. De nombreux vaccins contre les toxines utilisent des toxines dénuées de toxicité (antigènes hautement immunogènes) qui incitent le système immunitaire à produire des anticorps qui neutralisent les toxines sécrétées. La méthode de détoxification chimique la plus largement répandue utilise le formaldéhyde. Une nouvelle méthode a été développée pour produire des toxines modifiées plus stables et immunogènes. L'application de la technologie aux toxines A et B de *C. difficile* a donné

lieu à des toxines détoxifiées (TxA et TxB) qui ont été facilement reconnues par une série d'anticorps monoclonaux neutralisants. Des travaux préliminaires ont montré que ces toxines avec comme adjuvant des esters de monosulfate d'acide gras (CMS) induisent des titres élevés d'anticorps neutralisants et une protection complète chez les souris contre l'infection à *C. difficile*. L'objectif du projet est donc de combiner ces toxines à un adjuvant puissant pour générer des niveaux élevés de réponses anticorps chez deux autres modèles animaux non-rongeurs.

La protection des muqueuses gastro-intestinales contre ces infections est assurée par des titres élevés d'anticorps IgG neutralisants circulant dans le sérum chez la souris et chez l'homme. Cette étude fournira ainsi des preuves scientifiques de l'amélioration de l'immunogénicité des nouveaux TxA et TxB équivalente à une infection naturelle chez la souris et par rapport aux toxines conventionnelles et de la synergie avec le nouvel adjuvant à base d'ester de monosulfate d'acide gras sélectionné chez des espèces non-rongeurs.

Le nombre total d'animaux est de 78 répartis en 2 expérimentations. La première porte sur 42 lapins (répartis en 6 lots de 6 lapins et 1 lapin supplémentaire par lot en cas de mortalité imprévue liée au modèle) et la seconde sur 36 porcs (répartis en 6 lots de 6 porcs). Ce projet s'inscrit dans la dynamique de respect de la règle des 3 R en expérimentation animale.

Remplacer : Aucun modèle *in vitro* ou *ex vivo* ne peut se substituer totalement à ce type d'expérimentation afin de tester l'innocuité et l'immunogénicité d'un vaccin et de son adjuvant.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant une étude de faisabilité. 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 chez la souris. Raffiner : Les animaux sont hébergés en groupe (enrichissement social, caresses et voix douce zootechnicien) dans des parcs avec enrichissement du milieu de vie (lapin : repose-pattes, tunnel, tasseaux de bois à ronger et porc : ballon et chaînes). Certaines procédures sont réalisées avec une récompense alimentaire ou une anesthésie appropriée.

17259 Les sources d'exposition aux faibles concentrations de substances radiologiques ou chimiques sont multiples qu'elles soient d'origine naturelle ou générées par l'activité humaine. Le rein est l'un des principaux organes cibles de la toxicité induite par des substances étrangères à l'organisme du fait de ses fonctions de filtration, de transport et de réabsorption de substances chimiques. Le présent projet s'intéresse à l'augmentation des risques d'atteintes rénales à long terme en particulier l'induction de cancer rénal après expositions chroniques ou répétées. En particulier le présent projet permettra d'étudier le potentiel carcinogène de l'uranium au niveau rénal en modélisant une exposition « professionnelle » par les voies aériennes supérieures tel que développé lors des études préliminaires réalisées dans l'établissement. Il apportera des éléments de réponse au manque de connaissances sur ce sujet. Ces études nécessitent l'utilisation d'animaux car l'évaluation du risque de développement de pathologie chronique telle que le cancer ne peut être évalué globalement *in vitro*. Dans ce projet, nous utiliserons deux modèles de souris transgéniques ayant démontré une incidence plus importante de survenue de cancers rénaux.

La conception de ce protocole répond aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'expérimentation animale. L'utilisation d'animaux transgéniques ayant une incidence plus importante de tumeurs rénales permettra de réduire fortement l'effectif d'animaux nécessaires par rapport à des animaux WT. Dans le contexte du bien-être animal, les animaux seront anesthésiés, prélevés et mis à mort selon la réglementation en vigueur. Ce projet nécessitera 600 souris mâles et femelles génétiquement modifiées. Les mesures de raffinements seront appliquées : enrichissement, isolement en cas d'agression, points d'arrêt définis en cancérologie.

17260 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

troubles neuro-développementaux. Parmi les possible causes de démyélinisation, on cite le traumatisme crânien.

Le traumatisme crânien (TC) est la cause la plus fréquente d'invalidité permanente chez les moins de 40 ans. Il s'agit en effet d'un véritable enjeu de santé publique. Cependant, la prise en charge des TC a été sous-représentée dans la recherche médicale par rapport à d'autres problèmes de santé.

La présence de lésions de la myéline a été impliquée dans l'altération des processus cognitifs post-TC. Une réponse inflammatoire robuste est bien reconnue dans le TC aigu, et comprend notamment une activation de la microglie, cette dernière étant le macrophage résidant du cerveau.

Plusieurs travaux ont montré que la Metformine, antidiabétique oral de référence pourrait réparer la myéline. Ce médicament a déjà fait ses preuves notamment dans la sclérose en plaque. La metformine pourrait également diminuer l'activation microgliale dans le traumatisme crânien. La pioglitazone est également un antidiabétique oral avec une action anti-inflammatoire connue à la fois sur le système immunitaire périphérique et sur la microglie. L'action synergique de ces deux médicaments pourrait agir à la fois sur la neuroinflammation post-traumatisme crânien mais également limiter les lésions de la substance blanche post-traumatiques.

Nous utiliserons un modèle de traumatisme crânien modéré par lâcher de poids d'une faible hauteur chez le souriceau OF1 de 7 jours (Septième jour de la vie postnatale : P7) sous anesthésie générale par Isoflurane. L'utilisation de ce modèle est particulièrement intéressante car il permet d'étudier les phénomènes inflammatoires longtemps après l'impact et à distance de l'impact. La procédure de traumatisme crânien a été validée lors d'un précédent dossier Apafis.

On injectera tous les jours les animaux en intra-péritonéal avec de la Pioglitazone et de la Metformine, les souris contrôles recevront du sérum salé isotonique. Puis après P21, les souris recevront leur traitement par gavage par une sonde, les souris contrôles seront gavées avec de l'eau.

Nous travaillerons uniquement sur des souris mâles afin d'éviter l'influence des hormones femelles sur les paramètres que nous allons mesurer.

Il s'agit d'un travail d'une durée de 3 ans pour lequel 880 souris seront utilisées.

Sur ce modèle, nous étudierons l'effet d'un traitement quotidien par Pioglitazone et Metformine : (1) sur les lésions de la substance blanche post-traumatique ;

(2) sur l'activation microgliale post-traumatique

Pour chacune des procédures nous travaillerons sur quatre groupes de souris

- le groupe de souriceaux ayant subi un traumatisme crânien et traité avec de la Pioglitazone et de la Metformine ;

Page 2

- le groupe des souriceaux contrôle (= groupe Sham) sans traumatisme crânien et traité avec de la Pioglitazone et de la Metformine

- le groupe de souriceaux ayant subi un traumatisme crânien et non traité ;

- le groupe des souriceaux contrôle (= groupe Sham) sans traumatisme crânien et non traité.

Nous réaliserons des prélèvements de cerveaux à différents stades :

- P45: pour l'évaluation des lésions de la substance en immuno-histochimie - P7-P8-P10-P15-P45 : pour l'évaluation de l'activation microgliale

Ces connaissances nous permettront par la suite d'améliorer la prise en charge et le traitement des patients traumatisés crânien.

Cette étude prendra en compte la réglementation des 3R :

- Remplacement : L'étude de l'impact du traumatisme crânien sur les réseaux neuronaux 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. Raffinement : La procédure de traumatisme (durée inférieure à 2

minutes) sera réalisée sous anesthésie générale inhalatoire par Isoflurane. Une analgésie 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. Les injections et le gavage seront réalisées par des personnes formées et compétentes. Des grilles de scoring seront proposées en fonction de l'âge des animaux déterminants ainsi les points limites prédictifs. Les animaux seront hébergés en groupe en milieu enrichi pour minimiser leur stress.

A la fin de l'étude les animaux seront sacrifiés selon les méthodes réglementaires.

17261 Les maladies métaboliques, telles que l'obésité et le diabète de type 2, ont une prévalence en constante augmentation au niveau mondial. Ces pathologies sont étroitement associées à une diminution de l'action de l'insuline, ou insulino-résistance, dans les tissus périphériques cibles de l'insuline. Il a été montré d'autre part qu'il y avait une altération de la fonction barrière de l'intestin des patients obèses ou diabétiques, et que cette altération pourrait être impliquée dans l'établissement de l'inflammation de bas grade qui caractérise ces pathologies.

L'objectif de ce projet est d'évaluer si l'insulino-résistance est impliquée dans les modifications de la susceptibilité à l'inflammation de l'intestin et dans les altérations de sa fonction barrière. Nous allons donc étudier si une insulino-résistance généralisée, induite par un régime hyperlipidique, ou une insulino-résistance restreinte au niveau de l'épithélium intestinal, induite dans une lignée de souris génétiquement modifiée, modifient la susceptibilité des souris à la colite consécutive à une infection par deux souches bactériennes, *C. rodentium* et *S. enterica*.

L'inflammation colique induite par *C. rodentium* est un modèle animal très utilisé pour étudier des pathologies humaines telles que les colites infectieuses ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). La bactérie *C. rodentium* est un pathogène naturel de la souris qui colonise la muqueuse colique et induit une inflammation, une dysfonction de la barrière épithéliale et une diarrhée. Chez des souris immunocompétentes, une infection avec *C. rodentium* entraîne une diarrhée et perte de poids modeste et transitoire et ces symptômes disparaissent en 3 à 4 semaines. Une augmentation de la susceptibilité à l'inflammation colique se traduit par une colonisation plus importante de la muqueuse intestinale, ainsi qu'une diarrhée et une perte de poids plus rapides et plus importantes chez les animaux concernés. Pour ce projet nous utiliserons une souche de *C. rodentium* qui exprime la luciférase, ce qui va permettre de suivre le développement et la résolution de l'inflammation du colon au cours du temps chez les mêmes animaux en utilisant une technique d'imagerie par bioluminescence *in vivo* chez le petit animal.

Nous utiliserons également un second protocole d'infection avec un modèle infectieux complémentaire qui met en jeu des mécanismes différents, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. L'inflammation induite par *S. enterica* serovar Typhimurium est un modèle animal très utilisé pour étudier des pathologies humaines telles que les enterocolites infectieuses non systémiques, car elle permet de mimer les réponses inflammatoires observées dans les infections à *Salmonelle* chez l'Homme.

Dans ce projet nous utiliserons 340 souris, 200 pour l'infection avec *C. rodentium* et 140 pour l'infection avec *S. enterica*. Ce projet faisant appel à des interactions hôte-pathogène ne peut être réalisé que *in vivo*. Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche soit en conformité avec les exigences de réduction et de raffinement. Les protocoles ont été élaborés pour utiliser le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous nous attacherons également à limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance journalière sera réalisée en respectant des ponts limites bien définis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les inter-relations existant entre les altérations métaboliques et l'insulino-résistance consécutives à l'ingestion d'un régime alimentaire hyperlipidique et la susceptibilité à l'inflammation intestinale et colique.

17262 Les traumatismes cervicaux induisent fréquemment, outre para et tétraplégie, des insuffisances respiratoires qui augmentent encore la dépendance des blessés médullaires (ventilation assistée) ainsi que la mortalité post-traumatique. En effet, dans les lésions cervicales, la dénervation partielle ou totale

des circuits thoraciques et lombaires compromet les voies motrices contrôlant les muscles intercostaux et abdominaux, et donc la contribution de ces muscles aux efforts respiratoires. De plus, la dénervation des circuits moteurs phréniques réduit voire abolit la participation du diaphragme, muscle inspiratoire principal, à l'activité ventilatoire. L'insuffisance respiratoire est ainsi le fait d'une paralysie ventilatoire complète ou de modifications du profil ventilatoire (respiration rapide et superficielle qui altère les échanges gazeux).

Ce projet vise à étudier l'effet d'un agent pharmacologique, la Buspirone, déjà utilisé en clinique à des fins d'anxiolytiques chez les patients para/tétraplégiques mais pour un effet encore inconnu sur la restauration de la fonction respiratoire. Nous supposons que, couplée à une électrostimulation neuromusculaire (ESNM) des muscles respiratoires, la Buspirone peut augmenter l'excitabilité des neurones qui ont survécu après la lésion et ainsi augmenter la ventilation spontanée. En effet, nous faisons l'hypothèse que l'ESNM permettra de potentialiser l'effet de la Buspirone en assurant une force minimale des muscles respiratoires et en favorisant les adaptations induites par la Buspirone au niveau de la lésion médullaire. Nous comparerons dans ce projet l'effet de la Buspirone seule ou combinée à l'ESNM sur la capacité ventilatoire mais aussi et surtout sur les modifications structurelles et fonctionnelles permettant cette amélioration. Parmi celles-ci, nous mesurerons la réponse électrique des nerfs respiratoires et la repousse nerveuse/neuronale potentielle.

Ces expérimentations seront menées suivant 6 procédures expérimentales chez des souris mâles. Les effectifs visés doivent se situer entre 10 et 15 animaux par groupe de façon à mettre en œuvre un calcul de puissance afin d'ajuster au minimum l'effectif d'animaux nécessaire dans chacune des procédures expérimentales. Ainsi, les effectifs envisagés sont de 196 souris mâles.

Ce projet respectera la règle des 3 R, et notamment, il visera à :

- 1) Remplacer. L'utilisation de neurones isolés en culture cellulaire ne permet en effet pas d'appréhender les relations entre les différentes structures neuronales et la fonction ventilatoire. Les expérimentations à réaliser permettront de mesurer les effets respiratoires et de les coupler à la caractérisation des mécanismes impliqués (régions cervicales et encéphaliques, populations cellulaires et systèmes de neurotransmission).
- 2) Réduire le nombre d'animaux. De plus, lorsque cela sera possible, ce seront les mêmes animaux qui seront engagés dans l'analyse de la commande respiratoire et des réseaux neuronaux modulant la respiration et dans l'analyse des populations cellulaires impliquées
- 3) Raffiner. Enfin, des points limites seront établis afin de réduire toute source d'angoisse et de souffrance et d'assurer le bien-être animal. Le suivi des points limites et l'observation régulière de l'état général des souris permettent d'arrêter à tout moment l'expérience pour éviter l'angoisse et la souffrance de l'animal.

17263 La drépanocytose est une maladie génétique qui touche plus de 5 millions de personnes dans le monde et est responsable d'une lourde morbidité. Elle est caractérisée par la prédominance de l'hémoglobine drépanocytaire (HbS) qui induit dans certaines conditions une déformation en faucille des globules rouges responsable de l'obstruction des petits vaisseaux entravant la distribution de l'oxygène aux organes. Cette souffrance d'organe est appelée crise vasoocclusive. Son unique traitement spécifique actuel, l'hydroxyurée, ne permet pas de prévenir toutes les crises. Des nouvelles thérapeutiques, plus ciblées sont nécessaires. Or les globules rouges des drépanocytaires sont particulièrement susceptibles d'être détruits (phénomène d'hémolyse) et d'activer le système immunitaire, notamment le complément – première ligne de défense contre les pathogènes via une cascade d'activation. Les données scientifiques récentes retrouvent en effet des fragments d'activation du complément dans le sang des patients atteints de cette maladie.

Notre objectif est d'approfondir la compréhension du rôle du système du complément dans la drépanocytose et le bénéfice thérapeutique de son inhibition. Il est donc nécessaire de tester les inhibiteurs du complément, à potentiel thérapeutique, sur un organisme vivant complet afin d'évaluer et d'anticiper le bénéfice éventuel apporté, qu'un système *in vitro* cloisonné ne permet pas. Nous travaillerons sur 2 modèles animaux : l'un où nous induirons une hémolyse et l'autre génétiquement modifié mimant la pathologie des patients. Nous testerons l'inhibition du complément comme traitement

préventif et curatif. Le rôle du C5 a déjà été prouvé dans d'autres pathologies hémolytiques où son inhibition permet de traiter efficacement les patients. Le C5 est la première molécule de la voie terminale de la cascade du système du complément permettant la lutte contre les pathogènes en formant un complexe moléculaire permettant de le dégrader. Lors de la drépanocytose le C5 est activé non pas des pathogènes, mais des cellules de notre propre organisme. Il représente donc une potentielle cible thérapeutique.

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 ainsi :

1) Replace (Remplacement) : Pour ces expériences, les modèles expérimentaux *in vivo* (animaux) sont les seuls permettant d'évaluer l'impact de l'activation du complément dans un organe entier sur la dégradation de sa fonction. Nous réaliserons en parallèle des expérimentations en culture cellulaire et étudierons des analyses d'échantillons humains afin de limiter au minimum les expérimentations animales. Cependant, 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.

2) Reduce (Réduction) le nombre d'animaux en expérimentation : L'anticipation des doses adéquates à injecter par l'étude bibliographique permettent de réduire le nombre de souris utilisées. Nous utiliserons un nombre de souris permettant d'avoir une analyse statistique robuste concernant les différentes procédures. Nous utilisons maximum 10 souris par condition expérimentale afin d'avoir le nombre d'animaux suffisant pour avoir des résultats statistiques adéquates.

3) Refine (Raffinement) : 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 pour créer un environnement non stressant pour l'animal (ils disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi par du coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Nous utiliserons des méthodes non invasives pour les analyses d'urines et le suivi. De plus, des points limites ont été établis, pour définir à quel moment d'euthanasier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles.

Chaque expérience sera réalisée 2 fois pour étudier l'atteinte rénale et l'activation du complément par des méthodes différentes non compatibles l'une avec l'autre (transcriptomique, imagerie et cytométrie en flux). Afin de valider notre hypothèse et de prouver l'efficacité de ces molécules dans nos conditions pathologiques, le nombre requis de souris est de 680

17264 L'hypoperfusion cérébrale chronique (HCC) est une conséquence courante de divers troubles vasculaires cérébraux qui survient fréquemment chez les personnes âgées et dans les maladies comme la démence vasculaire ou encore Alzheimer. La HCC est connue pour provoquer une aggravation des déficits cognitifs, sensorimoteurs et une altération générale du comportement. Sur la base de travaux dans un modèle d'accident vasculaire, pour lesquels la molécule X a démontré des effets protecteurs, ce projet a pour but d'en évaluer le bénéfice dans la démence vasculaire cérébrale.

Ainsi, cette étude vise à évaluer l'effet du traitement sur la récupération sensorimotrice et cognitive dans un modèle d'occlusion bilatérale permanente des artères carotides communes (BCCAO) chez le rat.

Ce modèle de démence vasculaire est le modèle qui reproduit au mieux la physiopathologie de l'hypoperfusion cérébrale chronique humaine, pour lequel les carotides communes seront ligaturées. Cette étude sera réalisée chez le rat (n=78 rats Sprague-Dawley mâles de 7 à 8 semaines) du fait que ce modèle ait été développé et très bien caractérisé dans cette espèce. De plus, ce modèle est couramment utilisé dans les études réglementaires pharmacologiques pour évaluer les effets de traitements pro-cognitifs.

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). Ce modèle est aujourd'hui très bien caractérisé chez le rat.

Aucun modèle informatique et/ou *in vitro* ne permet de modéliser de tels mécanismes. Ainsi, l'étude de la récupération fonctionnelle post-HCC 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. Dans un but de raffinement, 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 de ce modèle ainsi que l'utilisation d'imagerie médicale IRM permettront de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés (n=78).

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. Le milieu d'hébergement des rats sera enrichi de manière optimale. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

17265 La destruction des globules rouges, appelée hémolyse, peut survenir précocement et massivement dans un contexte pathologique, tel que dans la drépanocytose ou dans le paludisme. Le contenu de la cellule, notamment l'hémoglobine (Hb), se déverse alors dans la circulation sanguine. L'Hb assure le transport de l'oxygène au sein de l'organisme. Elle contient 4 noyaux d'hème qui, en cas d'hémolyse, se retrouvent libres et peuvent réagir avec d'autres éléments circulants ou certains récepteurs cellulaires. L'activation produite par leur rencontre entraîne une réponse cytotoxique, pro-inflammatoire et pro-oxydante, dont les acteurs et les mécanismes sont encore mal déterminés. Les anticorps (Acs), protéines du système immunitaire, sont capables d'interagir avec l'hème. Un Ac dit monoclonal reconnaît de manière spécifique un motif appelé antigène (Ag). Le complexe Ac-Ag formé est reconnu par des cellules immunes, permettant la neutralisation des agents pathogènes. Cependant, au contact de l'hème, l'Ac peut devenir poly-réactif et reconnaître de nouveaux Ag, possiblement portés par nos propres cellules. L'acquisition de cette nouvelle poly-spécificité a pu être démontrée *in vitro*, et plus récemment *ex vivo*, dans notre laboratoire à partir d'échantillons de sang de patients atteints de drépanocytose. Ce phénomène d'auto(poly)réactivité pourrait jouer un rôle dans la dégradation de la fonction de certains organes, notamment le rein. En effet, en situation d'hémolyse, la fonction rénale est particulièrement atteinte, et on peut retrouver des dépôts d'Acs à la surface des glomérules. De ce fait, l'objectif de notre projet est de déterminer à partir de modèles animaux reproduisant un contexte hémolytique si ces dépôts sont bien favorisés par l'hémolyse et s'ils sont à l'origine des lésions provoquant l'insuffisance rénale. Les deux mécanismes les plus probables seraient celui d'un dépôt de complexes immuns pro-inflammatoire au niveau glomérulaire, ou celui d'une cytotoxicité directe des Acs par reconnaissance d'auto-Ags membranaires. Nous souhaiterions étudier le rôle de ces Acs sur la fonction rénale au cours de l'hémolyse (par injection de phénylhydrazine (PHZ) - un agent chimique hémolytique), déjà rapportée dans un modèle sauvage C57Bl6. Nous utiliserons différents modèles murins, l'un exprimant majoritairement un Ac se liant à l'hème et devenant polyréactif et l'autre produisant majoritairement un Ac ne se liant pas à l'hème. Ces modèles nous permettraient de comparer les paramètres cliniques, biologiques et histologiques objectifs consécutifs à une hémolyse et de corrélérer la poly-réactivité induite des Acs en conditions hémolytiques avec les paramètres cliniques mesurés. La différence de l'effet pathologique chez des souris produisant ou non des Acs poly-réactifs induits par hémolyse chez des souris C57Bl6 validera cette hypothèse. L'utilisation d'un organisme vivant complet est nécessaire pour évaluer l'impact de la poly-réactivité induite des Acs. L'hémolyse constitue un facteur commun à un large panel de maladies ; la compréhension des mécanismes mis en jeu ici nous permettrait d'apporter des moyens préventifs et curatifs des lésions organiques secondaires à des pathologies, notamment rénales. L'extension de ce domaine de connaissance pourrait permettre l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques. Conformément à la directive 2010/63/UE et des arrêtés du 1er février 2013, les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R :

Remplacement : Les expériences menées *in vitro* nous ont permis de remplacer dans un premier temps le modèle animal. 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 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 françaises. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les animaux malades seront soignés ou euthanasiés. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

Afin de valider notre hypothèse et prouver l'efficacité de ces molécules dans nos conditions pathologiques, le nombre requis de souris est de 108.

17266 La maladie neurologique liée à des mutations du gène ADCY5 se caractérise par des mouvements anormaux incontrôlés, diffus et invalidants, qui commencent dans l'enfance et persistent toute la vie. Cette maladie n'a pas de traitement. La protéine correspondant à ce gène, AC5, est fortement exprimée dans une région profonde du cerveau appelée le striatum. Le striatum est justement une structure très importante pour le contrôle du mouvement. Le but de notre étude est de comprendre les mécanismes de cette maladie pour en rechercher un traitement, mais ce travail pourrait aussi permettre de mieux comprendre comment le striatum intervient dans le contrôle du mouvement, et ainsi permettre d'envisager des nouvelles pistes pour traiter les maladies du mouvement en général.

Les mutations du gène ADCY5 changent l'activité de la protéine AC5 dans le striatum, ce qui est à l'origine des mouvements anormaux. Les conséquences des mutations de ADCY5 ont été étudiées de façon préliminaire dans des modèles cellulaires. Elles doivent maintenant être caractérisées *in vivo* dans une approche intégrée. Nous avons pour cela généré une lignée de souris portant la mutation R418W qui est la plus fréquente chez les patients. Les souris portent une mutation sur une des deux copies du gène (hétérozygotes) ou les deux (homozygotes). L'objectif général de ce projet est de déterminer les difficultés motrices de ces souris et de caractériser les anomalies de fonction de l'AC5 (gain de fonction ou perte de fonction) consécutives à cette mutation, ainsi que leurs conséquences sur le fonctionnement des neurones dans le striatum. Nous avons choisi de commencer par une évaluation motrice des souris par une procédure comportant le test de l'open field et du rotarod, qui fait l'objet de cette demande. Nous prévoyons d'utiliser pour cela 60 souris : 20 souris transgéniques homozygotes, 20 souris transgéniques hétérozygote et 20 souris contrôles.

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien.

Concernant le remplacement, les études *in vitro* et sur les invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements tels que les mouvements anormaux et leurs conséquences sur la motricité normale. Les rongeurs, en revanche, utilisent leurs pattes avant pour effectuer des mouvements complexes et sont donc des modèles particulièrement bien adaptés.

Concernant la réduction, des expériences précédentes nous ont permis de définir le nombre minimal d'animaux permettant de générer des données statistiquement solides.

Concernant le raffinement, pour toute cette étude, les conditions d'hébergement et les protocoles expérimentaux utilisés ont été optimisés pour exposer les animaux au minimum de douleur et d'inconfort possible. Les animaux seront hébergés en groupe de 2 à 5 animaux, dans un environnement à température contrôlée, avec cycle diurne-nocturne de 12h. L'eau, la nourriture seront fournies ad libitum et un nid végétal est placé dans chacune des cages de manière à offrir aux animaux un minimum d'enrichissement. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien. L'évaluation de la douleur et de la détresse est réalisée en observant l'aspect des souris et leur comportement. Les points limites seront pour l'apparence et la posture : poil ébouriffé, perte excessive de poils, blessure cutanée, automutilation, dos courbé, yeux enfoncés, couché sur le côté, hypothermie. Pour les comportements anormaux ces points limites seront : agressivité soudaine, abattement, inactivité, vocalisation et mutilation, isolement, apathie, prostration, diminution de l'appétit et amaigrissement, changement des périodes de sommeil, réduction de la mobilité. Ces contrôles seront enregistrés et doivent permettre de repérer tout animal

malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Le cas échéant, des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques) si trouble mineur ou passagé, ou bien mise à mort réglementaire par CO₂.

17267 Le développement cérébral peut être contrarié par la présence d'anomalies génétiques chez l'embryon, ou la survenue d'infections, de traumatismes, ou d'accidents vasculaires pendant la période périnatale. Les conséquences à long terme sont étudiées chez l'adulte dans des modèles rongeurs.

L'objectif de ce projet est d'analyser l'état fonctionnel des vaisseaux sanguins cérébraux de souris et de rats adultes, par une méthode utilisant les ultrasons, qui permettent d'obtenir des images précises des vaisseaux. Les ondes ultrasonores pénètrent profondément dans le cerveau, ce qui permet d'enregistrer l'ensemble des vaisseaux, de la surface jusqu'à plusieurs millimètres de profondeur. Les enregistrements sont réalisés en condition basale, et en réponse à la stimulation des moustaches. Les résultats obtenus permettent de mieux comprendre comment le sang circule dans le cerveau, dans une situation normale ou pathologique, ou sous l'effet de médicaments.

Cette méthode sera utilisée chez des souris ou rats adultes normaux, ou issus de modèles d'anomalies du développement cérébral, et recevant des substances à tester en aigu, comme des médicaments, ou des molécules connues pour induire la réaction inflammatoire. Chaque substance fera l'objet d'une demande d'autorisation de projet spécifique. La présente demande pourra être citée dans chaque projet en tant que technique standardisée d'imagerie.

La durée totale de manipulation pour chaque animal est de 2h. Les mesures durent environ 45min, et sont réalisées sous anesthésie, pour éviter les mouvements et l'inconfort de l'animal. Le protocole anesthésique est spécifique à chaque espèce ou souche. La sonde de mesure sera juste placée sur la peau du crâne. Les animaux seront euthanasiés par des méthodes réglementaires. Les mesures sont réalisées sur les animaux d'une même série, un par un au cours d'une journée entière, ce qui permet de conserver des réglages stables de l'appareil de mesure, sans interruption. Ainsi, le prélèvement du cerveau de ces animaux sera donc réalisé le lendemain.

Pour obtenir des résultats homogènes, un calcul statistique a déterminé que 15 animaux par groupe expérimental étudié était nécessaire. Ce nombre peut être augmenté à cause de l'instabilité du signal, qui nécessitera éventuellement une duplication de chaque groupe. Au total, chaque groupe expérimental utilisera donc au maximum 30 animaux. Nous estimons que 10 substances seront testées dans les 5 ans. Avec un groupe contrôle par substance testée, 20 groupes expérimentaux seront explorés, soit au maximum 600 animaux.

Application de la règle des 3R :

- Remplacement : il n'est pas possible dans le cadre de ce projet puisqu'aucun modèle invertébré ou modèle cellulaire *in vitro* ne permet de reproduire la réactivité vasculaire du cerveau des mammifères.
- Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera minimisé : si les résultats sont significatifs avec un seul lot de 15 animaux, nous n'utiliserons pas de 2nd lot.
- Raffinement : les mesures seront réalisées sous anesthésie. Tout signe d'inconfort pendant l'enregistrement induira l'arrêt de l'expérience. Toute souffrance observée après le réveil constituera un point limite et entraînera l'euthanasie.

17268 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 motoneurones (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 des lipides influence la sévérité de la maladie.

Il a été démontré que le métabolisme des lipides est fortement perturbé chez les patients SLA ainsi que dans des modèles de SLA et de dénervation musculaire (modèles SLA et autres maladies neurodégénératives). Il a été démontré que certains lipides complexes participent au maintien et à la

régénérescence des unités motrices (1 unité motrice = 1 motoneurone + les fibres musculaires qu'il contrôle). La modulation des niveaux de lipides, en ciblant spécifiquement l'enzyme GBA2 (impliqué dans le métabolisme des lipides) par une approche médicamenteuse a montré des effets neuroprotecteurs dans un modèle de souris SLA et dans un modèle de souris sauvages après lésion du nerf sciatique.

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.

L'enzyme GBA2 est un acteur clef du métabolisme et est fortement augmentée 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 modèles de SLA exprimant ou non GBA2 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 GBA2. 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.

17269 Le projet est dédié au développement d'une molécule thérapeutique visant l'amélioration des fonctions cognitives chez les personnes porteuses de trisomie 21. La présence d'un chromosome 21 surnuméraire conduit, entre autres choses, à des déficits d'apprentissage et de mémoire qui varient entre les individus. Actuellement, des soins médicaux et paramédicaux sont donnés aux patients, mais il n'y a pas de traitement des déficits cognitifs à proprement parler. Le soutien, l'éducation, l'intégration sociale ont changé de manière significative la qualité de vie des personnes porteuses de trisomie 21, dont l'espérance de vie (55 ans) a doublé au cours des 20 dernières années.

L'objectif du projet est de développer un nouveau composé appartenant à une série chimique innovante qui sont des inhibiteurs de DYRK1A, une kinase impliquée dans la physiopathologie de la trisomie 21 par son action au cours du développement puis du fonctionnement du système nerveux. Cette kinase est localisée sur le chromosome 21, et surexprimée dans la maladie. Nous avons précédemment

montré que le thé vert et son principal composant, l'EGCG sont des inhibiteurs non sélectifs de DYRK1A et peuvent améliorer les performances cognitives chez des souris modèles de trisomie 21. Nous avons aussi montré *in vitro* l'activité et la sélectivité de cette nouvelle famille de molécules inhibitrices de DYRK1A. Après des études de structure-activité sur ce prototype brevetable, nous avons sélectionné le meilleur composé, le NG134, afin de tester sa capacité à réduire les déficits cognitifs chez des souris modèles de trisomie 21.

Les procédures expérimentales 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. L'hébergement ainsi que les traitements ont été optimisés afin d'éviter les procédures douloureuses.

Le nombre d'animaux utilisés est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Il comporte les animaux reproducteurs puisque le traitement est initié pendant la gestation. Le nombre d'animaux a été calculé sur la base des études mises au point et publiées précédemment. Chaque lot de souris analysées dans les différents tests comportementaux comportent 12 souris contrôles et 12 souris transgéniques.

Ce projet met donc en jeu 68 animaux : 20 pour la reproduction et 48 pour les études comportementales. Ces nombres sont optimisés pour les tests réalisées et tiennent aussi compte du déficit cognitif des souris transgéniques.

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..

17270 Les muscles squelettiques assurent de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Aussi, leurs altérations peuvent avoir des répercussions sur la fonction motrice et la qualité de vie des patients. L'industrie du secteur agroalimentaire ou pharmacologique s'oriente vers le développement de produits qui visent à diminuer les états de fatigue ou de faiblesse musculaire. Notre équipe développe un ensemble d'approches expérimentales afin d'évaluer l'efficacité de nouveaux produits, alimentaire ou pharmacologique, pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire. Ainsi, nous envisageons de tester 15 produits en 5 ans.

Pour chaque composé testé, des souris âgées entre 4 semaines et 18 mois seront traitées pendant une durée définie en fonction du composé et de l'objectif visé. Le traitement s'effectuera par différentes voies en fonction du composé à tester. Le mode d'administration par voie orale via l'eau de boisson ou l'alimentation sera privilégié. Les traitements seront associés au non à un entraînement sur tapis roulant des animaux. Les animaux seront répartis en 6 groupes maximum, selon le nombre de molécules ou de doses à tester et les groupes référents nécessaires, avec un effectif de 15 animaux maximum par groupe.

Un ensemble de paramètres sera évalué pour l'étude des effets des composés sur le comportement général et la fonction motrice des animaux. Ainsi, le poids des animaux, leur consommation alimentaire et hydrique seront mesurés. La force d'agrippement (Grip test), les capacités de déplacements horizontaux et verticaux (Actimètre), la curiosité (Planche à trous), la coordination motrice (Rotarod), l'endurance et la résistance à l'effort (Wire test), l'anxiété et dépression (Croix surélevée, Préférence de place, et préférence du sucrose), la fatigue musculaire lors de la mesure du temps de nage (Swimming test), les mémoires (test d'olfaction, test de reconnaissance d'objet, test du labyrinthe en T), ainsi que les caractéristiques de marche (analyseur de marche) seront analysées avant, au cours et/ou à la fin du traitement. Chaque test sera réalisé après une période de familiarisation des animaux avec les différents systèmes utilisés. Cette répétition de mesures non invasives permettra de suivre régulièrement 1) l'état des animaux 2) les effets des traitements sur les animaux. Cette approche *in vivo* sera complétée par des techniques *in vitro* d'analyse de la fonction musculaire afin d'identifier les cibles d'action des composés. En fin de traitement, les animaux seront ainsi euthanasiés, plusieurs muscles et organes seront prélevés et pesés, et les propriétés contractiles des muscles isolés (contraction *in situ*) ou de faisceaux cellulaires isolés des certains muscles (contraction *in vitro*) seront analysés.

Ces approches permettront de mettre en évidence au niveau préclinique les effets musculaires de composés à destination de l'industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique. Les études conduites sur des animaux âgés nécessitent de tenir compte de leur taux de mortalité. Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en tenant compte de la validité statistique, des contraintes des modèles et des approches expérimentales. Les méthodes utilisées sont validées et majoritairement non invasives, des périodes d'acclimatation et d'habituation sont systématiquement effectuées. Lors de la réalisation des procédures expérimentales, un renforcement positif par récompense est mis en place pour limiter le stress des animaux. Aussi, le modèle animal est le seul permettant une évaluation de la fonction motrice dans sa globalité. Au stade préclinique, ce modèle permet également de voir non seulement les effets d'un composé sur le système ou une fonction d'intérêt mais également les effets sur l'ensemble de l'organisme.

Au final, sur 5 ans pour 15 produits, 1 350 animaux seront utilisés pour mener à bien ce projet.

17271 L'ischémie critique des membres inférieurs est un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés ; son risque est accru par la proportion croissante de patients diabétiques ou obèses. Cette pathologie a un pronostic très sombre puisque, à un an, seule la moitié des patients survivent sans amputation majeure. Plusieurs essais thérapeutiques visant à favoriser le développement de nouveaux vaisseaux pour revasculariser le membre malade ont été réalisés mais sans succès. Notre projet entre dans le cadre de la compréhension des processus pathologiques conduisant à l'ischémie critique dans le but de proposer de nouvelles thérapies. Une des limites actuelles pour la recherche de ce domaine est le manque d'outils permettant de mesurer la perfusion des petits vaisseaux irriguant le muscle.

L'objectif de ce projet est de tester si une technique d'imagerie de pointe (microscopie 2 photons) nous permettrait de visualiser et de quantifier le flux sanguin dans les petits vaisseaux irriguant le muscle chez des souris anesthésiées saines et diabétiques, chez lesquelles une ischémie du membre inférieur aura été induite ou non par chirurgie. Ce programme de recherche sur 5 ans impliquera 40 souris.

Dans ce projet nous respecterons les 3R:

Remplacer: Le lien entre la perfusion sanguine et une pathologie complexe comme la diabète ne peut pas être étudié avec des modèles *in vitro* de cellules en culture, nous ne pouvons donc pas remplacer ce modèle animal.

Réduire: Pour réduire le nombre d'animaux, aucune expérience déjà publiée ne sera reproduite. Notre expertise concernant les modèles murins d'ischémie du membre inférieurs (20 ans) garantit que le nombre d'animaux utilisés est minimisé. Dans ce cadre, 10 animaux par groupe sont nécessaires pour obtenir des résultats exploitables statistiquement.

Raffiner: Nos mesures mis en place pour réduire la douleur pendant les procédures expérimentales impliquent une induction et suivi de l'anesthésie, une mise en place d'analgésie en pre et post-opération, une installation tout au long des procédures de contrôle de la température par tapis chauffant, avec un respect particulier de la notion de points limites adaptés.

Les animaux sont hébergés en cage collective enrichie par un igloo et de quoi faire un nid. L'eau et la nourriture sont fournies à volonté.

17272 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement d'un composé d'intérêt thérapeutique, destinés à l'amélioration des troubles métaboliques, notamment l'obésité. Une première étude pilote, réalisée par le laboratoire pharmaceutique client de l'étude, a montré que le composé induit une perte de poids corporel associé à une diminution de prise alimentaire chez des souris obèses.

L'objectif de la présente étude sera de confirmer et de compléter ces résultats préliminaires en évaluant l'impact à plus long terme du composé sur la prise alimentaire, le poids corporel et la régulation glycémique chez des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique (60% de l'énergie issue des graisses) pendant 16 semaines avant démarrage du traitement. Le traitement sera administré par voie orale pendant les 8 semaines suivantes, pendant lesquelles les animaux seront soumis au même régime enrichi en graisse. Au cours du traitement, les paramètres suivants seront mesurés: poids

corporel et prise alimentaire, composition corporelle, glycémie à jeun ou à l'état nourri et tolérance au glucose. Le traitement sera administré à trois doses différentes. Des groupes contrôles additionnels, appelés groupes pair-fed, seront employés et nourris avec la même quantité de nourriture journalière que les groupes traités. Ces groupes permettront de définir si la perte de poids observée résulte uniquement de la diminution de prise alimentaire ou si d'autres mécanismes sont impliqués

Par ailleurs, afin d'explorer l'implication éventuelle de la thermogénèse dans les effets du composé, une partie des animaux seront hébergés à une température de thermoneutralité (29-32°), alors qu'une autre sera hébergée à température ambiante (22-25°C).

La présente étude nécessitera l'emploi de 120 souris C57Bl/6 réparties en 10 groupes expérimentaux de 12 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 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 individuelles du fait de la nécessité de mesurer précisément l'impact du composé sur la prise alimentaire individuelle des animaux. Néanmoins, les animaux conserveront des contacts visuels avec leurs congénères et un enrichissement des cages 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.

17273 La COVID-19, maladie infectieuse causée par le coronavirus SARS-CoV-2, est une pandémie mondiale qui a infecté plus de 30 millions d'individus et déjà causé plus de 1 millions de décès dans le monde (chiffre de l'OMS). La gravité de l'épidémie de COVID-19 souligne la nécessité de développer des vaccins prophylactiques rapides et efficaces. Les connaissances scientifiques suite aux infections antérieures des coronavirus (SARS-CoV-1, MERS-CoV) montrent que le système immunitaire développe des réponses humorales (réponses anticorps) et cellulaires contre ce type de virus respiratoire. Les stratégies vaccinales sont presque exclusivement concentrées sur l'induction d'une réponse immunitaire humorale avec des anticorps neutralisants, mais celle-ci peut s'avérer insuffisante du fait d'un niveau insuffisant ou non persistant des anticorps. La vaccination à l'aide d'antigènes peptidiques issus des protéines du virus est une approche alternative et/ou complémentaire qui permet d'induire une immunité cellulaire, médiée notamment par les lymphocytes cytotoxiques. Actuellement la majorité des vaccins sont administrés par voie systémique (intradermique, intramusculaire.). Cependant, des travaux ont montré que la vaccination par voie muqueuse (intranasale) induisait une plus forte réponse immunitaire locale dans les poumons et une plus forte induction de cette sous-population, comparée à une voie d'administration par voie systémique.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'un vaccin prophylactique composé de peptides dérivés de SARS-Cov2 *in vivo* chez des souris humanisées, administré soit par voie intra-nasale soit par voie systémique (sous-cutanée). L'efficacité d'une vaccination ne peut être évaluée que dans des organismes entiers car les modèles *in vitro* ne permettent pas de mimer fidèlement les réponses immunitaires. C'est pourquoi l'expérimentation utilisant un modèle animal est indispensable.

Nous comparerons l'efficacité sur la réponse immunitaire des voies d'administrations, l'effet de 1 ou 2 injections de vaccin, les réponses à court et à long terme, ainsi que l'âge des animaux vaccinés. Les réponses immunitaires seront analysées dans les poumons, les lavages broncho-alvéolaire, la rate, et du sang sera prélevé pour faire des dosages.

Cette étude nécessitera 528 animaux sur 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, 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. Le lavage broncho-alvéolaire, prélèvement des poumons et du sang seront réalisés après une anesthésie générale profonde des animaux avant leur sacrifice. 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 de valider en préclinique un vaccin prophylactique contre le SARS-CoV-2 responsable du Covid-19, des essais cliniques chez l'homme pourraient être ensuite envisagés.

17274 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.).

17275 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. Une autre alternative consiste à 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% naturelle pour faire fuir les rats. Le seul moyen de le vérifier 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 différents bois et de différentes huiles essentielles issues de ces bois et leur comportement sera observé (attraction/répulsion/sans effet).

Respect de la règle des 3R :

Remplacement : il n'est pas possible de réaliser des 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.

Raffinement : les animaux seront simplement manipulés pour être transférés de la cage à un enclos de test contenant des croquettes et une odeur. La période de mise à jeun sera réduite au minimum nécessaire pour induire une attraction des animaux pour la nourriture, il n'est pas question de les affamer.

Cette étude ne va donc engendrer aucune souffrance pour les animaux. A la fin de l'étude les animaux seront conservés en vie.

17276 Les pathologies et mutations génétiques qui induisent les dommages temporaires ou permanents de l'oreille interne causent des déficits fonctionnels importants chez le patient. Les altérations de la fonction auditive (surdité) et de la perception des sons en relation avec le système nerveux central (acouphènes), lorsqu'elles sont persistantes ou congénitales, deviennent handicapantes avec pour conséquences des problèmes de communication, d'isolement, de dépression et des problèmes cognitifs et d'apprentissage. De même les crises aiguës de vertiges temporaires ou permanentes sont difficilement supportables et empêchent tout fonctionnement autonome quotidien. Actuellement, en l'absence de traitement spécifique et efficace, la surdité neurosensorielle nécessite une rééducation, moyennant une prothèse auditive, or la production mondiale de prothèses auditives répond à moins de 10% de l'ensemble des besoins et à moins de 3% de ceux des pays en développement. Nous

travaillons actuellement à l'identification et au développement de traitements ciblés pour satisfaire ce besoin médical en santé publique

Ce projet répond aux demandes des autorités réglementaires liées aux identifications et développement de candidats médicaments. Après avoir identifié, testé et sélectionné les meilleurs candidats potentiels dans des études *in vitro* (réalisées en amont), il est nécessaire que ces composés démontrent efficacité et sécurité *in vivo* chez l'animal avant passage chez l'Homme. La capacité des candidats-médicaments à atteindre les cibles dans l'oreille interne et traiter la surdité, le vertige ou les acouphènes, ne peut être évaluée que chez l'animal avec une oreille interne et système nerveux central complet, capable de reproduire le fonctionnement et les symptômes observés chez le patient. De plus, pour soutenir le développement d'un candidat-médicament, il est nécessaire de bien établir la posologie du produit et la fenêtre thérapeutique avant d'entrer en phase clinique. Le projet comprend quatre procédures et participe au raffinement car les trois premières procédures proposées (issues des précédents projets) correspondent aux trois modes d'induction de pathologies et symptômes chez le rongeur que sont : les atteintes toxiques locales de l'oreille interne, les atteintes ototoxiques systémiques (comme les antibiothérapies ou chimiothérapies) et les atteintes acoustiques par l'exposition au bruit.

La quatrième procédure offre elle une nouvelle modalité thérapeutique via la thérapie génique. Cette alternative a pour objectif de traiter les surdités d'origine génétique et consiste à transférer une copie saine (non mutée) du gène défectueux ou absent, afin de rétablir l'expression de la protéine déficiente en vue de traitement curatif chez des patients. Ce projet permet d'élargir le champ d'intervention à un plus nombre de maladies et symptômes, ainsi que de documenter l'interaction entre les atteintes aiguës, leurs traitements et le vieillissement. Chacune de ces procédures reproduit la situation clinique chez le patient et permet de vérifier l'efficacité des candidats-médicaments, ainsi que d'étudier leur pharmacocinétique.

Le projet couvre l'utilisation d'au maximum 22260 rongeurs (9030 rats et 13230 souris) sur 5 ans. Les études réalisées au sein du centre de recherche, par du personnel formé et compétent, ayant déjà contribué aux lancements de deux programmes de développement clinique, sont encadrées par des recommandations internes, incorporant tous les aspects en lien avec le recours à l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques (éthique, hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur, inconfort ou détresse chez l'animal (par l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques). Une analyse statistique optimise les méthodes expérimentales employées, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire. Tous ces éléments assurent l'application maximale du principe des 3R.

17277 La neurotensine (NTS) est une hormone du tractus gastro-intestinal, qui participe à la digestion des aliments. La neurotensine a de nombreuses actions qui sont d'origine centrale ou périphérique, comme la régulation de la prise alimentaire, de l'activité locomotrice, de la température, de la pression artérielle, de la gestion du stress, et l'absorption des acides gras, etc. Son action est transmise à la cellule par des récepteurs, le plus important étant le récepteur de haute affinité, le NTSR1.

Notre projet de recherche s'est focalisé depuis de nombreuses années sur le rôle du couple NTS-NTSR1 dans le cancer. Ainsi nous avons pu démontrer que la neurotensine était un facteur lié à l'agressivité tumorale, par ses actions sur la croissance tumorale et sur les processus métastatiques. Dans les tumeurs, ses effets sont principalement transmis par l'activation du récepteur de la neurotensine de haute affinité, le NTSR1. Ce récepteur est surexprimé dans les cancers solides. Nous avons montré que l'expression élevée de NTSR1 est un marqueur de mauvais pronostic pour les cancers du poumon, du sein, et pour de nombreux autres cancers. L'expression de ce couple est également associée à la résistance aux traitements anticancéreux. Nous avons donc cherché à développer des stratégies thérapeutiques qui vont inhiber ce couple NTS-NTSR1 afin de diminuer l'agressivité des tumeurs et de restaurer la réponse aux traitements.

La NTS est synthétisée à partir d'un précurseur qui est clivé pour produire le peptide. Un défaut de clivage produit une forme longue de la NTS, le LF-NTS. Cette forme présente la même activité biologique que le peptide mature, mais est beaucoup plus stable. Les taux circulants élevés de LF-NTS sont corrélés au développement du cancer du sein, et à la mortalité globale. La NTS et le NTSR1 sont

exprimés de manière concomitante dans 30 à 60 % des cancers. Dans le but d'inhiber les effets de la NTS, nous avons développé un anticorps neutralisant dirigé contre la forme LF-NTS. Notre stratégie est de diminuer l'activité du NTRS1 et ainsi réduire l'agressivité tumorale. Les données précliniques démontrent qu'effectivement l'anticorps murin dirigé contre LF-NTS diminue la croissance de la tumeur, réduit les processus métastatiques, et améliore la réponse aux sels de platine. Afin d'établir l'innocuité de cet anticorps, nous avons pratiqué des traitements à long terme à des doses thérapeutiques efficaces pour le traitement des tumeurs et de leurs métastases. Ces traitements n'ont montré aucun effet toxique du traitement, mais plutôt des effets bénéfiques. Ainsi, ils 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 et globalement améliorer la qualité de vie des patients. L'objectif est d'ajouter cet anticorps aux traitements à base de sels de platine, lorsque les patients présentant un cancer métastatique du poumon sont en rechute après les thérapies ciblées ou les immunothérapies, ce qui correspond à 70 % des patients. Toutes ces données ont été obtenues par des données précliniques en utilisant un anticorps murin, afin de pouvoir utiliser cette thérapie en clinique humaine, il faut développer, caractériser, et valider les formes humaines et humanisées de cet anticorps. Ceci correspond à l'évolution de notre projet et de cette demande.

L'ensemble des résultats obtenus seront inclus dans la demande d'autorisation pour pratiquer une phase 1 chez l'Homme.

Type d'animaux : Modèle murin commercial immuno-déficient.

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 2550 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. Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble.

Remplacement : Le criblage *in vitro* va nous permettre de remplacer l'utilisation d'animaux en utilisant les techniques de culture cellulaire L'objectif étant de sélectionner les meilleurs anticorps candidats. Ces clones sélectionnés seront utilisés pour la partie *in vivo* qui fait l'objet de la présente demande. Néanmoins, un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu qui est au cœur de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier. 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.

17278 Le rôle des médiateurs de l'inflammation et notamment celui des récepteurs impliqués dans l'inflammation vasculaire au cours des pathologies inflammatoires chroniques de la peau telles que le psoriasis est un enjeu majeur tant en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée (développement de biothérapies ciblant ces récepteurs).

Un modèle murin de psoriasis a été développé depuis plus de 10 ans. Il s'agit d'un modèle de psoriasis induit par l'application topique d'une crème (imiquimod). Bien que reproduisant de nombreuses caractéristiques physiopathologiques et histologiques de la maladie humaine, ce modèle fait l'objet d'une critique majeure liée à son caractère inflammatoire aigu. En effet, une inflammation cutanée forte est obtenue au bout de 5 à 6 jours seulement d'application quotidienne d'imiquimod, alors que le psoriasis est considéré comme une maladie chronique. De plus, certains médiateurs dans d'autres

modèles murins d'inflammation pourraient jouer un rôle dans la phase chronique/tardive de la maladie et ne peuvent donc pas être correctement étudiés dans ce modèle d'inflammation cutanée à court terme. Pour pallier ce défaut, un modèle de psoriasis chronique a été décrit chez la souris consistant à appliquer l'imiquimod sur l'oreille et la peau du dos de l'animal de manière séquentielle pendant 9 semaines.

Des récepteurs sensoriels de la peau sont exprimés au niveau de l'épiderme, des nerfs et des vaisseaux. Ils sont suspectés de jouer un rôle dans le développement du psoriasis, sans que leurs rôles soient clairement identifiés, en particulier dans l'inflammation vasculaire associé au psoriasis.

Outre les phases précoces, le modèle chronique de psoriasis nous permettra d'étudier *in vivo* chez la souris le rôle deux récepteurs sensoriels différents (TRPV1 et TRPV3) dans la phase chronique de la maladie. Pour mener à bien ces travaux, nous utiliserons plusieurs lignées de souris transgéniques dont l'expression du récepteur TRPV1 ou TRPV3 est invalidée globalement ou de manière spécifique dans différents types de cellules de la peau.

Au terme du traitement, les souris seront anesthésiées afin d'effectuer des mesures non invasives pour caractériser la fonction barrière, les propriétés mécaniques et vasculaires de la peau. Les techniques utilisées sont indolores ; elles sont également utilisées chez l'homme.

Notre projet respecte la règle des 3R. Afin de limiter le nombre d'animaux, deux mesures seront réalisées lors d'une même anesthésie. De plus, des échantillons de peau et d'organes seront collectés sur les animaux mis à mort. 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. 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 au minimum et pesées une fois par semaine minimum. Les points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Ce projet concernera 2800 souris au maximum.

17279 Les pneumopathies bactériennes représentent un défi majeur de santé publique. Après guérison, il perdure une cicatrice immunologique rendant l'organisme plus tolérant aux agressions futures. Cette tolérance peut être responsable d'infections bactériennes secondaires (infections liées aux soins) et de réactivations virales aggravant le pronostic des patients, augmentant leur durée de séjour hospitalier, et générant un surcoût important pour la société.

Une population de monocytes inflammatoires, non présente à l'état basal, apparaît après résolution de l'inflammation initiale et semble être une des caractéristiques de cette cicatrice immunologique.

Le but de ce projet sera donc d'explorer cette population de monocytes inflammatoires en la caractérisant d'un point de vue phénotypique, en évaluant ses capacités de phagocytose et de production de cytokines, et en déterminant son rôle dans la mise en place et le maintien de la cicatrice immunitaire.

Au total, ce projet nécessitera 2096 souris C57Bl/6, 168 souris SIRPa ^{-/-}, 168 souris CLEC-1 ^{-/-}, 50 souris CD45.1, et 456 souris d'une lignée Knockout soit un total de 2938 souris.

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.

17280 La génération des réponses humorales, c'est à dire la capacité d'un hôte de produire des anticorps, en grande quantité et de bonne qualité, en réponse à un pathogène est cruciale pour la résolution des infections et la génération d'une mémoire immunitaire. La compréhension des mécanismes qui régulent la réponse humorale est particulièrement importante dans l'optique d'amélioration des réponses immunitaires ou vaccinales.

L'objectif du projet est de chercher à comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les lymphocytes T (LT) régulent les lymphocytes B (LB) et permettent la génération de réponses anticorps fonctionnelles. Plus précisément, sera étudié le rôle d'une molécule particulière (l'intégrine beta8 ou $\beta 8$), exprimée par les LT, dans la régulation des réponses lymphocytaires B.

Ce projet se décompose en deux grandes parties. Premièrement seront développés des modèles de souris génétiquement modifiées complexes pour permettre de cibler l'expression de l'intégrine $\beta 8$ spécifiquement dans les populations lymphocytaires d'intérêt. Pour ce faire, des transferts de plusieurs types cellulaires de différentes origines seront effectués. Une fois ces modèles établis, ils seront utilisés dans plusieurs tests standards pour évaluer les réponses anticorps face à différents types de stimulations. Enfin, sera également testé le rôle de cette intégrine dans un contexte de réponse auto-immunes. L'approche séquentielle du projet permettra le cas échéant de réduire le nombre d'animaux utilisés.

De manière générale, ce projet permettra d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les réponses anticorps sont générées et contrôlées. Ces résultats seront non seulement essentiels pour l'expansion des connaissances fondamentales sur les réponses anticorps mais mettrons aussi en exergue des pistes potentielles pour l'amélioration des réponses vaccinales ou la prévention de l'apparition d'auto-immunité liée aux anticorps.

Comme la complexité de l'environnement tissulaire et le réseau complexe de cellules immunitaires impliquées dans ces mécanismes ne peuvent pas être reproduits entièrement *in vitro*, cette étude nécessite la réalisation d'expériences à l'échelle de l'animal.

Les souris utilisées dans ces expériences permettront aussi de mettre au point un certain nombre de modèles *in vitro* pour limiter notre dépendance aux modèles animaux (Remplacement).

L'ensemble des souris de ces protocoles expérimentaux seront de plus suivies au moins 2 fois par semaine pour repérer précocement et mettre fin à tout signe de souffrance. Certaines procédures possèdent des points limites plus précis et plus adaptés aux actes réalisés (Raffinement). Lorsque cela adapté, des anesthésies locales ou générales seront réalisées afin de prévenir la souffrance des animaux.

Il est prévu d'utiliser au maximum 4640 souris pour l'ensemble des procédures décrites ce dessous.

17281 Les anticoagulants oraux sont des médicaments indispensables dans le traitement des phlébites et embolies pulmonaires, ainsi que dans la prévention des accidents vasculaires cérébraux dans certaines pathologies. Depuis 5 ans, de nouveaux anticoagulants oraux (NACO) sont apparus sur le marché. Ils peuvent, comme les autres anticoagulants, être à l'origine de complications hémorragiques parfois graves.

Ces anticoagulants oraux ont l'inconvénient, du moins actuel, de ne pas disposer d'antagonistes en cas de complications hémorragiques graves, d'être « nouveaux » avec un recul faible sur les effets à long terme, de ne pas disposer de dosage biologique attestant une prise correcte et d'être sensiblement plus coûteux. De plus les anticoagulants oraux directs ne peuvent être donnés pour certaines populations à risque (patients âgés, insuffisants rénaux et hépatiques, patients polymédiqués).

Dans cette étude, nous souhaitons développer une forme thérapeutique des ReGeneraTing Agents (RGTA) comme anticoagulant par voie orale dépourvu de toutes formes toxicologiques et avec un meilleur rapport bénéfice/risque.

Dans un premier temps, nous allons tester la capacité des RGTA administrés par voie à passer la barrière digestive (Procédure 1). Nous allons ensuite étudier la cinétique d'absorption des RGTA à travers la barrière digestive, en utilisant une dose sélectionnée de RGTA sur une période de 8 heures

(Procédure 2). Nous allons également étudier les effets potentiels des deux formes choisies de RGTA à la suite des 2 procédures précédentes sur l'hématopoïèse normale sur une période de 4 semaines.

Procédure 1. Pour tester la capacité d'une gamme de doses RGTA pour passer la barrière digestive après administration par voie orale, nous allons utiliser des souris Swiss (mâles) âgés de 6-8 semaines: 100 souris.

Procédure 2. Pour d'étudier la cinétique d'absorption RGTA à travers la barrière digestive (en utilisant une dose définie de RGTA), nous allons utiliser des souris Swiss (mâles) âgés de 6-8 semaines: 340 souris.

Procédure 3. Pour d'étudier les effets potentiels des RGTA administré par voie orale sur l'hématopoïèse normale, nous allons utiliser des souris Swiss (mâles et femelles) âgés de 6-8 semaines: 260 souris.

Dans sa totalité, ce projet utilisera au maximum 700 souris Swiss

Pour cette étude, nous respecterons au mieux la règle des 3R :

Remplacement : Alors que nous avons déjà mis en évidence l'activité anticoagulante de RGTA *in vitro*, nous avons besoin de tester la capacité de doses spécifiques de RGTA compatibles avec une utilisation clinique afin de développer une forme orale de RGTA en vue d'une utilisation thérapeutique, (passage de la barrière digestive). Nous avons également besoin de vérifier si les doses utilisées n'ont pas d'effets néfastes sur l'hématopoïèse *in vivo*. De telles études nécessitent l'utilisation de modèles animaux.

Réduction : Pour chaque condition expérimentale, un nombre minimal de souris sera utilisé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour la Procédure 3, pour réduire le nombre total de souris utilisées, nous effectuerons des numérations répétées sur les mêmes souris 1 fois par semaine, pour une durée totale de 4 semaines. Si des différences sont observées, une partie de ces souris (n=3) sera sacrifiée afin de réaliser des analyses histologiques (moelle osseuse).

Raffinement : Pour les Procédures 1 et 2, le sang sera prélevé sur les animaux anesthésiés et les souris seront sacrifiées immédiatement après, réduisant ainsi la souffrance animale. Notons que dans des études antérieures, aucune toxicité n'a été observée sur des animaux auxquels des RGTA ont été administrés aux doses que nous utiliserons.

La Procédure 3 de cette étude, sera également réalisée sous anesthésie et sera effectuée une fois par semaine pour une période de 4 semaines.

17282 La leishmaniose à *Leishmania infantum* est une infection parasitaire, naturellement transmissible de l'animal à l'homme et vice-versa, mais elle n'est, en aucun cas, transmissible directement du chien à l'homme. En effet, ces parasites sont transmis de mammifère à mammifère 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, aucun vaccin humain n'est commercialisé et seulement deux vaccins pour les chiens ont reçu une autorisation de mise sur le marché pour l'Europe. De plus, les quelques traitements qui existent, posent des problèmes de toxicité élevée et de nombreuses résistances aux traitements sont rapportées. Après avoir recherché des nouveaux traitements *in vitro*, nous avons trouvé une famille de molécules naturelles issues de plantes, possédant une activité contre le parasite. Nous souhaitons donc étudier dans le modèle murin (souris) l'efficacité de cette famille de molécules contre une infection à *Leishmania*. Ce projet de recherche appliquée vise à tester des molécules candidates, d'origine naturelle, contre la leishmaniose et ainsi trouver des traitements plus efficaces, avec moins d'effets secondaires. Dans ce projet, nous répondrons à la règle des 3Rs: Réduction: Afin d'utiliser un nombre restreint d'animaux, nous utiliserons des parasites capable d'emmètre de la lumière, cela permettra de suivre au cours du temps le niveau d'infection de chaque souris et de voir en temps réel l'effet du traitement sans devoir euthanasier les souris à chaque fois. Remplacement: Nous avons testé l'ensemble des molécules *in vitro*, sur différents types cellulaires et aucune cytotoxicité n'a été relevé. Il nous faut donc maintenant passer sur un organisme intégré, ce qui nous oblige d'utiliser les animaux. Raffinement: Lors du suivi de l'infection,

l'utilisation d'une anesthésie gazeuse sera réalisée afin d'éviter tout stress inutile aux animaux. Pour ce projet, 1560 souris seront utilisées.

17283 Les systèmes de délivrance de médicament peuvent être des dispositifs médicaux ou des formes galéniques visant à améliorer l'efficacité d'un médicament tout en réduisant ses effets secondaires, grâce à la maîtrise de la vitesse, du moment ou du site de libération, dans l'organisme, de la substance pharmacologiquement active. L'association du principe actif avec des particules biodégradables utilisées comme transporteurs, permet de cibler certains organes ou cellules principalement en fonction 1) des propriétés de ces particules comme leur dimension ou taille, la charge positive ou négative, etc, 2) la voie d'administration de ces particules et 3) l'état physiopathologique du sujet. Des études récentes ont permis de mettre en évidence un ciblage privilégié du foie lorsque des particules chargées négativement étaient injectées par voie intra-veineuse. Ce ciblage dit passif permet d'envisager une délivrance privilégiée de principes actifs dans cet organe, et le développement de thérapeutiques plus efficaces pour lutter contre des pathologies touchant le foie.

Parmi celles-ci, la maladie du foie gras non-alcoolique (NAFLD en anglais) qui peut évoluer en stéatose hépatique non-alcoolique (NASH) est la cause majeure de maladie chronique du foie dans le monde. La NASH (qui concerne 10 à 30% des personnes atteintes de NAFLD) peut évoluer vers un fibrome puis une cirrhose (10 à 15% des personnes atteintes de NASH) et cancer hépatiques. Cette maladie est en pleine expansion à cause de l'augmentation du nombre de personnes atteintes d'obésité et de diabète. Aucun traitement médicamenteux n'est actuellement disponible.

Nous avons développé et caractérisé *in vitro* une stratégie thérapeutique combinant des particules synthétiques biodégradables avec un principe actif reconnu *in vitro* et *in vivo* pour induire l'autophagie. Utilisé dans plusieurs modèles pathologiques *in vivo*, aucun risque de toxicité majeur n'a été mis en évidence avec ce principe actif. Au contraire, l'autophagie est phénomène naturel des cellules, qui consiste à dégrader des composants intracellulaires dysfonctionnels et potentiellement dangereux pour la cellule. Ce mécanisme de protection de la cellule permet également de recycler ces composants pour fournir de l'énergie à la cellule. L'autophagie peut être sollicitée pour réduire la stéatose hépatique (c'est-à-dire dégrader les gouttelettes de gras accumulées dans les cellules du foie), et réduire l'inflammation excessive des personnes atteintes de NASH.

L'intérêt de l'association de ce principe actif avec les particules biodégradables pour réduire la stéatose a été démontré *in vitro* sur plusieurs modèles cellulaires (dont des hépatocytes). L'évaluation de cette thérapeutique pour traiter le foie stéatosé est donc envisagée.

Cependant, les particules transportant le principe actif sont légèrement différentes de celles dont il a été démontré qu'elles ciblent le foie. Elles sont en effet cationiques, et il convient d'évaluer l'impact de cette modification sur la capacité de ces particules à cibler le foie (la cible thérapeutique) pour y délivrer la substance active. De plus, l'état physiopathologique de l'individu pouvant impacter la prise en charge de ces vecteurs, l'efficacité de ciblage par ces particules sera également évaluée dans un contexte pathologique de souris obèse et présentant une stéatose hépatique.

L'objectif de cette étude est donc d'utiliser des particules fluorescentes, afin de suivre leur biodistribution après injection intra-veineuse par un outil non invasif d'imagerie : le FMT pour fluorescent Molecular Tomography. Cet appareil permet de suivre *in vivo* des événements grâce à des sondes fluorescentes, de manière précise, avec une pénétration tissulaire importante, et une analyse quantitative. Le recours notamment à des sondes fluorescentes près de l'infra-rouge et adaptées à la recherche sur l'animal permet de s'affranchir de l'auto-fluorescence dans le vert des tissus biologiques. Lors de ce projet, la cinétique de biodistribution sera évaluée en analysant et quantifiant à différents temps la présence des particules fluorescentes, anioniques et cationiques. Pour cela, les souris seront observées par tomographie et mises à mort à différents temps afin de prélever les organes et de les étudier selon différentes techniques utilisant la fluorescence.

Ces expérimentations chez l'animal sont l'étape préliminaire mais indispensable d'une projection d'études cliniques chez l'Homme.

Ce projet est conforme aux principes des 3Rs.

Réduction : l'imagerie *in vivo* chez la souris par le tomographe est une méthode non invasive et offre la possibilité de suivre des phénomènes biologiques complexes comme l'efficacité d'un traitement par des mesures répétitives, tout en évitant la mise à mort régulière de grands effectifs d'animaux, en comparaison d'une approche *in vivo* invasive.

Le recours à un modèle déjà utilisé auparavant avec ces particules fluorescentes (souris SKH1) pour comparer l'effet de la charge sur la biodistribution des particules permet de limiter des étapes de mise au point, car la quantité de fluorophore à utiliser pour des résultats à la fois quantifiables et sensibles est déjà connue.

Remplacement : L'impact de la charge de surface ou de l'état physiopathologique des individus sur la biodistribution des particules nécessite une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de ce projet car il requiert l'analyse dans un organisme entier. De plus, nous souhaitons identifier et prélever les organes ciblés selon la voie d'administration. C'est pourquoi le modèle murin, qui est un modèle 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.

Raffinement : Les techniques peu invasives seront utilisées, comme l'imagerie. Tous les gestes invasifs (prélèvements, injections ou acquisition des images) et la mise à mort seront réalisés sous anesthésie. 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 558 animaux sur une période de 2 ans.

17284 Ce projet expérimental s'inscrit dans le cadre du projet DESTINATION 2024 dont l'objectif est d'améliorer la prise en charge et le pronostic des patients atteints d'une hypertension pulmonaire post-embolique (HPPE); Une partie du projet nécessite l'étude de modèles animaux afin de mieux comprendre cette maladie et de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'HPPE se développe chez 1 à 3% des patients après une embolie pulmonaire et aboutit à une insuffisance cardiaque droite et au décès dans plus de 50% des cas 5 ans après le diagnostic en l'absence de traitement. Cette maladie est diagnostiquée chez environ 300 patients par an en France, mais il s'agit d'une maladie sous-diagnostiquée. L'HPPE est lié à une obstruction persistante des artères pulmonaires de gros calibre, ainsi qu'au développement d'une atteinte des petits vaisseaux du poumon situés dans les branches plus distales des artères pulmonaires. L'HPPE est une maladie que l'on peut guérir par la réalisation d'une chirurgie de désobstruction des artères pulmonaires (endarterectomie artérielle pulmonaire). Cette opération est le traitement de choix de l'HPPE et permet, par une baisse des pressions artérielles pulmonaires, de faire disparaître l'essoufflement et d'enrayer l'évolution vers l'insuffisance cardiaque et le décès. Cependant, l'accès à cette chirurgie n'est pas systématique et seulement 50% des patients avec une HPPE peuvent bénéficier de cette intervention chirurgicale. De plus certains patients conservent une hypertension pulmonaire résiduelle à cause de l'atteinte des petits vaisseaux non accessibles lors de la chirurgie. Ainsi, pour ces patients il est indispensable de pouvoir proposer des traitements spécifiques de cette atteinte des petits vaisseaux. L'objectif de cette étude est d'identifier les mécanismes biologiques de cette pathologie afin de les cibler avec des médicaments.

Plusieurs voies biologiques cellulaires sont impliquées dans l'atteinte microvasculaire des artères pulmonaires et sont de potentielles cibles thérapeutiques dans l'HPPE pouvant permettre une amélioration de la qualité de vie des patients, une diminution de l'essoufflement à l'effort et possiblement une diminution de la mortalité par insuffisance cardiaque droite. De plus, l'atteinte microvasculaire semble être très dépendante du sexe, puisque dans certaines maladies avec une atteinte microvasculaire pulmonaire pure, telle que l'hypertension pulmonaire primitive, 80% des patients sont des femmes.

Afin de déterminer quelle(s) voie(s) biologiques sont les plus impliquées dans la microvasculopathie des territoires occlus et non occlus, il est nécessaire de mesurer et de comparer les niveaux d'altération de ces voies biologiques à partir de tissus pulmonaires issus de territoires occlus et non occlus prélevés distinctement au sein de mêmes individus. Cette approche n'est pas envisageable à partir de tissus

humains puisque les territoires pulmonaires occlus et non-occlus ne sont pas anatomiquement distincts. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal qui présente des caractéristiques anatomiques et physiologiques proches de celles de l'homme, et de reproduire les caractéristiques physiopathologiques de l'HPPE qui permette une analyse distincte des territoires pulmonaires occlus et non-occlus à partir d'échantillons de taille suffisante. Aussi, nous étudierons ces atteints microvasculaires de manière comparatives chez des mâles et des femelles, afin de déterminer s'il existe des mécanismes différents entre les sexes.

Il a été défini par analyse statistique qu'un effectif minimal de 44 porcs sera nécessaire, incluant 22 porcs de sexe masculin et 22 porcs de sexe féminin. Les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés. Le principe de remplacement se traduit par le fait que la majorité du projet DESTINATION 2024 relatif aux procédures diagnostiques, au dépistage et à la prise en charge thérapeutique est réaliser dans le cadre de recherche clinique; et qu'un projet d'analyse du shear stress des cellules endothéliales est réalisé *in vitro* directement à partir de cellules de cultures humaines et de patients, sans nécessité de recourir à l'expérimentation animale. Le principe de réduction se traduit par la limitation du nombre d'animaux au minimum nécessaire pour atteindre une significativité statistique; les tests statistiques ont été choisi pour satisfaire à l'analyse d'un nombre réduit d'animaux par groupe. Le principe de raffinement se traduit par l'utilisation d'un modèle expérimental établi et publier ce qui diminue grandement la morbi-mortalité liée au développement d'un modèle; Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée et seront stabulés en groupe de deux dans des cages de 2m² (individus de poids <50kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire les stress. Leur environnement sera enrichi (activité de fouissement encouragée, médecine ball, jeux dans le couloir, pesée sous forme de jeux avec récompense, planche à gratter, distributeur d'aliment actif). Les méthodologies employées seront en parfait accord avec les règles d'expérimentation animale. Elles tiennent compte de la notion de point limite et définissent des critères d'interruption d'expérimentation. Les procédures proposées n'induiront que des souffrances modérées grâce au recours systématique d'une anesthésie générale et d'antalgiques dès que cela est nécessaire.

17285 En Europe, l'élevage de poules anciennement en cage, évolue rapidement vers des systèmes hors cage. Ce changement signifie une augmentation de la taille des groupes de poules qui entraîne l'apparition de picage. Actuellement, la méthode la plus sûre et efficace pour réduire le picage est le traitement des becs, aussi appelé époinçage. Cependant l'époinçage est également une pratique remise en question. Dans ce contexte, il est important de pouvoir étudier d'autres stratégies permettant de lutter contre le picage. En élevage expérimental, il n'y a pas de picage d'observé. Il est donc nécessaire de l'induire afin d'étudier des mesures permettant de réduire son incidence ou sa sévérité. L'objectif de ce projet étant majoritairement comportemental, il n'est pas possible de passer par des modèles *in vitro* ou *in silico* (Remplacer).

Ce projet sera conduit sur 600 poules sur 5 ans. Les poules sont installées dans des cages (50x30cm) sur une période de maximum 86 semaines, entre 14 et 100 semaines d'âge. Le nombre d'animaux concernés est nécessaire pour obtenir des résultats significatifs (Réduire).

L'objectif de ce projet est d'induire du picage dans une première phase, limitée dans le temps, puis de tester des solutions techniques pour limiter ou arrêter ces comportements sur les semaines suivantes.

L'induction du picage se fera sur une période de 4 semaines maximum avec l'augmentation de la luminosité, l'absence d'enrichissement dans les cages, la mise en place de 3 poules par cage et la limitation alimentaire pouvant aller jusqu'à 70% des recommandations nutritionnelles. Les apports nutritionnels seront cependant suffisants afin de garantir la bonne santé des poules.

Durant ce projet des mesures non invasives peuvent être réalisées : score d'emplumement, état de santé, comportement, analyse des fientes et performances zootechniques. Des paramètres sanguins peuvent également être analysés sur maximum 150 animaux. Le nombre de prises de sang est limité à maximum 1 prise de sang toutes les 4 semaines, avec un volume maximum de 10mL par animal et par prise de sang.

Après la période du projet, les animaux retourneront en circuit classique. Une partie des animaux (150 maximum) peuvent être euthanasiés pour réaliser des prélèvements intestinaux afin d'étudier l'immunité intestinale.

Durant toute la période du projet, des animaliers passent minimum 2 fois/jour pour s'assurer du bien-être des animaux et contrôler l'environnement. De plus, lors du prélèvement sanguin, 2 tentatives maximum sont autorisées par série de prélèvement. L'objectif, durant la phase d'induction du picage, est d'observer un picage sur 50% à 80% des cages afin de maximiser la probabilité d'observer l'efficacité des solutions testées. Cette phase, d'une durée maximale de 4 semaines, s'arrêtera dès que ce seuil (50% maximum pour du picage sévère, jusqu'à 80% maximum pour du picage léger) est atteint. La phase de test des solutions de lutte contre le picage pourra commencer. Pour toutes les lésions liées au picage, du cicatrisant sera appliqué. Si, durant la phase de test des solutions, le niveau de picage reste important (lésion supérieure à 2cm²) plus de 5 jours de suite, un enrichissement sera installé. Sur l'ensemble des périodes d'essai, si des animaux sont trop sévèrement touchés (lésions supérieure à 5cm² ou plus de 3 zones de picages, malgré les points limites et l'utilisation de cicatrisant. Les animaux seront euthanasiés par électronarcose puis exsanguination. (Raffiner)

17286 Le but de cette étude est d'évaluer l'impact d'une molécule sur la circulation du liquide céphalorachidien (LCR) chez la souris. Les mécanismes contrôlant le flux cérébral de LCR sont complexes et semblent impliqués dans l'hémostasie du métabolisme cérébral, y compris l'élimination des déchets cérébraux. La molécule étudiée dans ce projet est une protéine bloquant la libération d'acétylcholine au niveau synaptique. Les données de la littérature montrent que cette molécule exerce un effet durable chez l'homme et peut se répartir dans l'organisme, quelle que soit la voie d'administration. Utilisées dans un premier temps pour traiter les troubles musculaires, les indications thérapeutiques de cette molécule sont étendues à d'autres pathologies telles que la douleur, les maux de tête et les accidents vasculaires cérébraux (AVC).

De ce fait, il se pourrait que les effets observés sur les maux de têtes et les AVC soient dû à son action sur le flux de LCR. Le but de l'étude est donc de valider cette hypothèse en étudiant le flux de LCR suite à l'administration de cette molécule chez la souris C57Bl6 mâle de 8 à 10 semaines.

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). Notre projet correspond à l'étape de validation *in vivo* d'une stratégie thérapeutique, qui fait suite aux validations réalisées *in vitro*. De plus, les études du flux de LCR au niveau cérébral sont très récentes, il n'existe actuellement aucun modèle informatique permettant de modéliser de tels mécanismes. Ainsi, l'étude de la circulation de LCR 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. Dans un but de raffinement, 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=63).

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.

17287 Problème majeur de santé publique avec 382 000 nouveaux cas estimés en 2018, les cancers sont la première cause de décès prématuré avant 65 ans en France. Pour comprendre le fonctionnement complexe de la cellule cancéreuse et faire ainsi progresser la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers, il est indispensable de disposer de modèles intégrés animaux proches de l'Homme, permettant d'évaluer *in vivo* l'interaction de ces cellules avec leur environnement. Les souris représentent ainsi un modèle de choix pour les études menées en cancérologie.

Les cancers sont caractérisés par des altérations portant sur de nombreux gènes. Après une première étape d'analyse *in vitro*, le recours à la souris génétiquement modifiée permet de comprendre le rôle

de ces gènes au niveau d'un organisme entier. Notre projet consiste à proposer aux chercheurs des lignées murines déjà existantes compatibles avec le standard sanitaire de nos animaleries par l'intermédiaire de ce qu'on appelle communément une DECONTAMINATION/REDERIVATION à partir d'animaux provenant de l'extérieur à nos installations et de statut sanitaire incompatible avec nos critères prédéfinis ainsi qu'une CRYO-PRESERVATION afin de se prémunir d'une perte de lignées précieuses uniques lors d'un accident et/ou d'éviter la production de souris non utilisées. Notre expertise nous permet d'avoir d'excellents résultats et donc de minimiser le nombre d'animaux requis. Nous prévoyons pour les 2 années à venir d'utiliser 1 008 souris.

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 une prise en charge de la douleur lors de procédures chirurgicales.

17288 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 neurocognitifs qui persistent à l'âge adulte même si ces enfants entrent dans un protocole de renutrition thérapeutique. De nombreuses études suggèrent que les macronutriments critiques dans cette période de la vie sont les protéines. Une alimentation appauvrie en protéines induit notamment un 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. Un probiotique se définit comme un micro-organisme vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels.

L'objectif de cette étude est de mettre en place chez la souris un protocole mimant les protocoles de renutrition chez l'enfant et d'étudier la dynamique de croissance dans ce contexte. Pour cela, les souriceaux seront alimentés avec un aliment appauvri en protéines pendant différents temps puis réalimentés avec un aliment normal. Nous étudierons ensuite si l'administration d'un probiotique pendant la période de réalimentation avec un aliment normal est susceptible d'améliorer la dynamique de croissance des animaux. Cette étude permettra donc l'établissement d'un modèle préclinique ouvrant la porte à de possibles visés 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. Des points limites bien définis et suffisamment précoces et prédictifs pour prévenir tout stress et toute douleur de l'animal ont été mis en place. Les conditions d'hébergement, les soins et les procédures seront réalisées par du personnel qualifié.

Cette étude se fera sur 270 souris

17289 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.

La phase préclinique qui consiste à étudier 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 anti-inflammatoire. Les molécules à tester peuvent être administrées par voie orale, intranasale, intrapéritonéale, intratrachéale, intraveineuse ou sous-cutanée, de manière préventive (1h à 15 jours avant induction de la maladie) ou curative (au moment de l'induction de la maladie). L'arthrite rhumatoïde peut-être induite chez l'animal de trois manières :

-par injection intraveineuse 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. Les animaux seront ensuite mis à mort 10-15 jours après l'injection pour analyser différents paramètres immunologiques et histologiques.

-par injection intradermique d'une solution de collagène et de l'adjuvant complet de Freund (CFA). Les animaux vont ainsi produire des anticorps contre le collagène et développer la maladie. Les animaux seront ensuite mis à mort 36-45 jours après l'injection pour analyser différents paramètres immunologiques et histologiques.

-par injection intraveineuse d'un cocktail de quatre anticorps monoclonaux dirigé contre le collagène de type 2 (ArtritoMab, MD Biosciences). Les animaux vont alors développer l'arthrite rhumatoïde. Les animaux seront ensuite mis à mort 12-15 jours après l'injection pour analyser différents paramètres immunologiques et histologiques.

Ceci permettra d'étudier l'efficacité *in vivo* des molécules testées sur le développement de la maladie (signes cliniques) et de l'inflammation.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. L'administration de sérum, de collagène ou de cocktail ArtritoMab à l'animal se fait sur animal vigile. Ce modèle induit des douleurs inflammatoires aiguës à l'animal, liées au développement de la maladie au niveau des articulations. Au cours de l'expérimentation, les animaux vont développer des symptômes caractéristiques de l'arthrite tels que l'inflammation et le gonflement des articulations aux niveaux des membres antérieurs et postérieurs. Des points limites prédictifs et adéquats ont été mis en place.

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 (selon les normes d'hébergement détaillées dans 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 ciblant l'arthrite rhumatoïde. 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 tel qu'un point limite impliquant l'utilisation de paracétamol.

-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.

17290 Un médicament n'est mis sur le marché pour les patients qu'après plusieurs années de Recherche et Développement. Les études précliniques, en amont des essais chez l'Homme, sont indispensables à l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité d'un candidat médicament. Celles visant à qualifier la sécurité du candidat médicament sont réalisées en accord avec la réglementation qui impose cette évaluation sur deux espèces mammifères, un rongeur (rats ou souris) et un non rongeur (chiens, mini-porcs ou primates non humains) (sauf cas particulier, par exemple pour les anticorps si une seule espèce est pertinente).

L'objectif de ce projet est de réaliser des études de sécurité préclinique afin d'évaluer les potentiels effets indésirables des candidats médicaments. Pour cela, les procédures mises en œuvre concernent le suivi clinique et biologique des animaux suite à l'administration unique ou répétée du candidat testé, par des voies identiques à celles prévues chez l'Homme, avec des prélèvements de fluides biologiques (par exemple : sang, urines) permettant de mieux caractériser les effets observés. Cela permettra

d'avoir des informations essentielles avant la première administration chez l'Homme ou bien de stopper le développement d'un candidat ayant un profil non satisfaisant en termes de sécurité.

Ce projet couvre l'utilisation d'un total maximum de 13530 animaux, dont 11200 rongeurs (7200 rats et 4000 souris), 540 chiens, 540 mini-porcs, et 1250 primates non humains pour une période de 5 ans. Le recours aux primates non humains est rendu nécessaire par certaines modalités thérapeutiques (notamment les anticorps) ou bien par la cible d'intérêt visée.

Concernant la recommandation des 3R sur le Remplacement, le projet est réalisé sur animal vivant car il n'existe aujourd'hui aucun modèle *in vitro* mimant la complexité des interactions d'un organisme entier et les effets possibles d'un candidat médicament sur celui-ci. Cependant, l'utilisation en amont de modèles *in vitro* mimant la structure et la fonction d'un organe (foie, cœur, rein...), pour l'évaluation des toxicités associées, permet un premier criblage des candidats médicaments. Le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes (Réduction) sont définis par des lignes directrices internationales et internes, sur des bases scientifiques et avec l'apport des biostatistiques afin d'avoir un effectif minimum mais statistiquement exploitable pour pouvoir interpréter les éventuels effets adverses. De plus, lorsque les objectifs d'étude le permettent et en accord avec le Vétérinaire clinicien, certains animaux peuvent être réutilisés, ce qui participe à diminuer le nombre total d'animaux utilisés. Enfin, concernant le Raffinement, ce projet fait l'objet d'une démarche qualité rigoureuse avec la réalisation des études par du personnel formé et compétent, le respect des impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvements réalisés sous anesthésie-analgésie pour les plus invasifs, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée. Le suivi clinique, au moins quotidien des animaux, permet la détection précoce de toute douleur, inconfort ou détresse et la mise en application de critères d'arrêt anticipés supervisée par le Directeur d'étude, le Vétérinaire clinicien et la Structure en charge du Bien-Etre Animal, afin que les animaux ne subissent pas plus qu'une contrainte modérée. Ces éléments assurent l'application maximale du principe des 3R.

Ce projet fait partie des prérequis indispensables à la mise sur le marché de nouveaux médicaments et de nouvelles stratégies thérapeutiques pour l'Homme, efficaces, plus sûrs et mieux tolérés et participe aux progrès scientifiques et biomédicaux.

17291 Les réactions d'allergie médicamenteuse, appelées également toxidermies médicamenteuses, sont des effets secondaires fréquents chez les patients hospitalisés (1-3%). Il s'agit de réactions d'hyperactivation de certaines cellules immunitaires, les lymphocytes T, au cours desquelles la prise de médicament est l'élément déclencheur. Ces réactions allergiques peuvent être de sévérité très variée. Les plus sévères sont connues sous le nom de nécrolyse épidermique toxique (NET). Il s'agit d'une réaction rare (2-4 patients/million d'habitants/an) mais extrêmement sévère, avec décollement et nécrose du tissu cutané, parfois sur l'ensemble du corps. Ces réactions sont potentiellement mortelles (~30%) ou entraînent fréquemment de graves séquelles (>50% des patients). Malheureusement il n'existe à ce jour aucun traitement ayant fait preuve de son efficacité dans cette pathologie, et la seule prise en charge consiste à arrêter le traitement responsable et à prendre en charge la cicatrisation des patients dans un centre de grands brûlés.

Des études réalisées chez les patients NET ont permis d'identifier un biomarqueur qui est exprimé de façon prédominante sur les cellules immunes responsables de la maladie. Ce biomarqueur constitue une cible de traitement nouvelle et prometteuse.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'activité thérapeutique d'un médicament déjà commercialisé qui cible ce biomarqueur, afin d'établir son intérêt potentiel pour traiter ces allergies médicamenteuses sévères. Ce médicament est prescrit à l'heure actuelle pour une autre indication clinique.

Comme il n'existe pas de modèle animal préclinique de NET, nous avons choisi d'évaluer l'activité de ce médicament dans un modèle de substitution, le modèle de la maladie du « greffon contre l'hôte ». Bien que les symptômes soient différents, les mécanismes cellulaires, impliquant les mêmes cellules d'intérêt, se ressemblent.

Les souris immunodéficientes, donc sans système immunitaire, seront greffées avec des cellules sanguines du patient par voie intraveineuse. Les souris se verront administrées le médicament responsable de l'allergie chez le patient (par voie orale). Les cellules humaines du patient, vont alors

reconnaître leur hôte, la souris, comme étrangère et provoquer la maladie du greffon contre l'hôte, d'autant plus qu'elles seront stressées par le médicament responsable de leur sur-activation. Les symptômes et signes cliniques seront évalués précisément sur chaque souris (perte de poils, perte de poids, anémie).

Un groupe d'animaux recevra le traitement par voie sous-cutanée ou intra-péritonéale afin de valider son efficacité sur les cellules responsables de la maladie, ce qui devrait permettre de limiter ou éviter l'apparition des symptômes, ou d'en réduire le délai d'apparition par rapport aux souris recevant la molécule contrôlée.

Dans un premier temps, nous validerons que le biomarqueur d'intérêt, la cible thérapeutique, est bien exprimé par les cellules du patient injectées à la souris suite à l'administration du médicament. En effet, les cellules des patients sont récupérées (avec consentement éclairé) lors de leur rendez-vous clinique, souvent lors des pics de leur maladie, et ces cellules alors très activées ne supportent pas toujours les étapes préalables à leurs greffes en modèle murin.

Dans un second temps, pour chaque patient dont les cellules auront été « validées », nous évaluerons l'activité thérapeutique du médicament.

Remplacer : Des études *in vitro* ont au préalable été réalisées sur des cellules de donneurs sains et de patients afin de vérifier l'effet de cette molécule thérapeutique sur des cellules exprimant la cible. Cependant, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation unique ce qui rend impossible une étude complète dans des tests *in vitro* (interaction avec d'autres cellules, tissus etc), c'est pour cette raison que le modèle expérimental chez la souris est indispensable et ne peut pas être remplacé avant d'envisager une application clinique.

Raffiner : Des études pilotes nous ont permis d'établir la cinétique d'apparition de signes cliniques et leur définition précise associée à ce type de rejet immunitaire, nous permettant de cibler les signes cliniques et symptômes associés spécifiquement à la maladie du greffon contre l'hôte. Nous surveillerons aussi les éventuels gènes associés aux différentes injections. La durée totale de l'expérimentation n'excèdera pas 42 jours. Les souris seront mises à mort dès l'apparition des points limites. Aucun traitement ne sera administré afin de ne pas biaiser les résultats et donc en cas d'atteinte de ces points limites les animaux seront sortis de l'étude immédiatement.

Réduire : le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. De plus, les expériences seront faites en séquentielles, si pour un patient donné, les cellules ne permettent pas de valider le modèle, alors la seconde partie de l'expérience pour valider le traitement ne sera pas effectuée pour ce patient. Pour cela nous utiliserons 318 souris.

17292 Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est un cancer cutané rare et agressif survenant principalement chez le sujet âgé de plus de 65 ans et le patient immunodéprimé. Son incidence, estimée à 1/100000 par an, est en constante augmentation. C'est un cancer agressif dont la survie à 5 ans est estimée à 40%. Le principal agent responsable de ce cancer est un virus. Une étude préliminaire a permis de mettre en évidence que ce virus induit l'expression d'une protéine appelée EZH2 (Enhancer of homolog 2 zest), dont l'implication dans d'autres cancers a déjà été démontrée. Par ailleurs, dans une cohorte de 96 CCM, les tumeurs contenant le virus ont montré une forte expression d'EZH2. Un médicament bloquant l'action de cette protéine, a été récemment approuvé dans le traitement d'autres cancers. Dans ce contexte, l'intérêt de ce traitement a pu être démontrée *in vitro* sur des lignées cellulaires de CCM. L'objectif de cette étude est d'évaluer *in vivo*, l'effet de ce traitement sur la croissance tumorale dans un modèle souris maîtrisé au laboratoire. Pour cela, après développement tumoral (environ 3 semaines), l'efficacité de 2 doses (250 mg/kg et 500 mg/kg) du traitement sera testée sur 24 souris (12 souris/ dose) par voie orale deux fois par jour pendant quatre semaines. L'ensemble de ces groupes sera accompagné par un groupe témoin recevant le véhicule (12 souris). La croissance tumorale des deux groupes sera comparée avec celle du groupe témoin. Au total 36 souris seront donc utilisées.

Ce protocole suit la règle des 3R :

Réduction : Deux doses de traitement seront testées sur la base des résultats de cytotoxicité *in vitro* préalablement testé au laboratoire ainsi que des données de la littérature réduisant ainsi le nombre de souris utilisées.

Raffinement : Les souris seront dans des cages enrichies avec des maisonnettes en plexiglas et du papier absorbant. Du fait du statut immuno-déficient des souris, l'ensemble du matériel d'enrichissement sera stérilisé.

Remplacement : Afin d'étudier l'impact thérapeutique du traitement sur la croissance tumorale, le test sur modèle murin est obligatoire

17293 La maladie de parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la mort des neurones à dopamine d'une région cérébrale appelée la substance noire compacte (SNc). Cette mort neuronale est responsable de profondes altérations motrices chez l'Homme. En plus des 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 et peuvent apparaître dès les stades précoces de la maladie. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est crucial pour la prise en charge et l'amélioration de la qualité de vie et le quotidien des patients.

Ce projet vise à étudier dans le contexte de la maladie de Parkinson le fonctionnement des neurones de la moelle épinière lombaire en lien direct avec une structure du cerveau produisant la dopamine, un neurotransmetteur qui joue un rôle clé dans cette maladie. Dans cette étude, nous allons analyser plus particulièrement les réponses comportementales chez la souris ainsi que l'activité électrique des neurones de la moelle épinière en utilisant des approches innovantes basée sur l'activation ou l'inhibition des neurones cibles en utilisant la lumière. Cette étude sera conduite sur deux modèles de souris de la maladie de Parkinson qui seront obtenus après l'injection d'une neurotoxine qui induit une lésion spécifique des neurones à dopamine pour mimer un stade avancé de la maladie ou d'un virus pour mimer un stade précoce et un stade modéré de la maladie. L'intérêt de cette étude est de comprendre l'origine des symptômes non moteurs de la maladie de Parkinson et ouvrir la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques.

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. L'utilisation d'anesthésique et d'analgésiques est prévue pour soulager 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, 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 un enregistrement de l'activité électrique des neurones au sein de l'organisme. De ce fait 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 concernera des souris mâles (n=10 par groupe) et femelles (n=10 par groupe), ce qui permet d'inclure tous les animaux des portées. Les 2 types d'animaux transgéniques prévus dans ce projet permettent de répondre aux objectifs scientifiques de l'étude, au total 1530 souris sont concernées.

17294 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 ».

L'hippocampe est divisé en plusieurs sous régions, connues pour jouer différents rôles. Parmi ces sous-régions, on retrouve le gyrus denté (GD), CA3 et CA1. Le GD est essentiel pour percevoir des différences de contextes et CA3 est impliqué dans la mémoire des événements vécus dans leurs contextes (ou mémoire épisodique). La connectivité entre ces deux régions est absolument essentielle au bon fonctionnement de l'hippocampe. La structure anatomique qui sous-tend cette fonction consiste en un réseau de fibres liant le DG à CA3, appelées fibres moussues (FM). Dans ce projet, nous allons chercher à mieux comprendre la plasticité synaptique des fibres moussues.

Le projet propose d'étudier le fonctionnement des circuits du CA3 *in vivo*, à l'aide d'enregistrements de l'activité électrique des neurones. Nous étudierons également l'effet sur la mémoire à travers des expériences comportementales.

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 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.

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. 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 à l'origine de l'encodage et la consolidation de la mémoire.

Pour pouvoir confirmer ces hypothèses, il est nécessaire d'étudier le fonctionnement des circuits de neurones du CA3, ainsi que le rôle joué par la plasticité synaptique dans ses circuits. Pour ce faire nous utiliserons un modèle animal transgénique dans lequel ces circuits sont affectés. Le planning général des expériences comprend plusieurs étapes 1) la chirurgie stéréotaxique, 2) des expériences de comportement 3) un prélèvement de tissu après anesthésie pour pouvoir réaliser des analyses *in vitro* sur tranche des circuits de la mémoire 4) des expériences *in vivo*.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises:

- Le même animal sera utilisé pour différents protocoles comportementaux afin de réduire le nombre total. Au total, ce projet nécessite l'utilisation de 680 souris sur 4 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.

- 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. Dans chaque expérience, des précautions seront prises pour diminuer l'impact stressant et douloureux des procédures expérimentales. 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.

- L'utilisation de systèmes simplifiés (cultures de cellules par exemple) ne peut reproduire le circuit neuronal suffisamment proche de l'architecture de l'hippocampe. Il est donc nécessaire d'avoir recours à un modèle animal. La souris est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés. L'organisation du système central de cette espèce est assez proche de celle de l'homme, ce qui permet une extrapolation des résultats obtenus.

17295 La grippe est une maladie infectieuse contagieuse causée par les virus influenza de type A et de type B. Chaque année 3 à 5 millions d'individus sont affectés par la grippe causant de 290 000 à 600 000 morts. La grippe est une infection des voies respiratoires (nez, gorge, poumons), associée à des symptômes tels que la toux, les maux de tête, et des contractures dans les muscles et les articulations. Plusieurs conditions cliniques sont associées à des complications musculaires liées à la grippe. Dans certains cas, l'infection par le virus de la grippe A (IAV) peut entraîner une pneumonie grave et évoluer

vers un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Une faiblesse musculaire prolongée et une altération fonctionnelle sont décrites chez les patients survivant au SDRA.

Ce projet vise à étudier et comprendre quelles sont les conséquences de l'infection par le virus de la grippe, notamment quand elle est associée à une réponse immunitaire forte, appelée orage cytokinique (cytokine storm), sur les muscles squelettiques et plus particulièrement sur les cellules souches du muscle qui permettent la maintenance du tissu musculaire et sa régénération.

Les résultats attendus sont une meilleure compréhension des symptômes associés à la grippe, pour une meilleure prise en charge clinique.

Ce projet comporte 3 procédures, dont 2 modérées (2680 souris) et une légère (360 souris), pour un total de 3040 souris pour 5 ans. Des animaux mâles et femelles seront utilisés.

Les objectifs de ce travail sont multiples.

Nos données préliminaires suggèrent que les cellules souches musculaires sont sensibles à l'inflammation associée à une forme aiguë de la grippe.

Nous souhaitons caractériser les changements subis par les cellules souches musculaires qui assurent le maintien et la régénération des muscles squelettiques.

Nous étudierons si ces modifications sont à court ou long terme un frein au bon fonctionnement des muscles.

Nous mettrons en œuvre pour chaque expérimentation :

- 1) Une analyse statistique optimisée de façon à déterminer le nombre minimal d'animaux nécessaires par groupe d'expérimentation (Réduction).
- 2) Des procédures d'anesthésie/analgésie pour toutes les manipulations quand elles sont nécessaires (Raffinement).
- 3) Des conditions d'élevage et d'enrichissement en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux (Raffinement).
- 4) Des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation sur l'animal par une mise à mort si signes de souffrance (Raffinement).

Par ailleurs, notre étude porte sur une réponse complexe et multifactorielle à l'infection virale et les cellules souches musculaires et de ce fait nécessite un modèle murin *in vivo*. Cependant, nous mettrons tout en œuvre, si possible, pour développer une approche *in vitro* (Remplacement).

17296 Ces travaux pratiques (TP) chez le rat sont destinés à des étudiants pour lesquels le Programme Pédagogique National de formation prévoit la mise en œuvre de protocoles expérimentaux *in vivo* afin d'étudier l'activité pharmacologique de grandes classes thérapeutiques telles que les benzodiazépines. La formation dispensée à ces étudiants peut conduire à des métiers en lien avec le domaine de l'expérimentation animale.

Dans ce contexte, les étudiants doivent acquérir un savoir-faire pour participer aux essais chez l'animal vigile et être en mesure de réaliser entre autres les traitements et les observations cliniques des animaux, afin de pouvoir candidater sur les postes proposés par les organismes publics ou privés de recherche.

D'autre part, cet enseignement pratique participe à une meilleure orientation de nos étudiants par la découverte concrète des exigences et responsabilités liées à l'utilisation de l'animal.

Ce TP répond à différents objectifs pédagogiques : mettre en pratique l'enseignement théorique, appliquer les règles d'éthique en expérimentation animale, garantir la traçabilité des données brutes, consolider la manipulation du rat vigile.

Ce TP permet également aux étudiants d'apprendre à réaliser des tests comportementaux chez l'animal et notamment à prendre en compte les contraintes expérimentales liées à la réalisation de ces tests.

Les étudiants étudieront l'effet d'un traitement au diazépam dans deux tests comportementaux permettant d'évaluer l'anxiété chez les animaux : le test de la chambre claire obscure et le test de la croix surélevée. Dans le test de la chambre claire/obscur, l'animal explore pendant 5 minutes un

environnement composé d'un compartiment noir et d'un compartiment éclairé, entre lesquels il peut se déplacer librement. Dans le test de la croix surélevée, l'animal est placé pendant 5 minutes dans un dispositif en forme de croix, composé de deux bras ouverts et deux bras fermés et placé à environ 80 cm du sol.

Ces deux tests se basent sur la mise en conflit de deux comportements spontanés chez l'animal :

- la prédisposition à explorer un nouvel environnement
- l'aversion des environnements lumineux, en hauteur et/ou non protégés, représentés par la zone éclairée et les bras ouverts dans le test de la chambre claire obscure et de la croix surélevée, respectivement.

Ce conflit comportemental génère une légère anxiété chez l'animal et les anxiolytiques, en diminuant l'anxiété des animaux, augmenteront leur comportement exploratoire.

Remplacement : Dans le cadre de la formation de nos étudiants, le Programme Pédagogique National prévoit, en pharmacologie, l'évaluation *in vivo* des effets et du mode d'action de molécules de référence par la mise en œuvre de protocoles expérimentaux.

Ce TP doit permettre d'une part d'illustrer les effets des benzodiazépines et d'autre part de renforcer l'apprentissage de nos étudiants à la manipulation du rat vigile (contention, administration par voie intrapéritonéale)

Par ailleurs le programme pédagogique précise pour nos étudiants que l'un des prolongements possibles à cette formation en pharmacologie *in vivo* est l'habilitation à participer à des expérimentations animales de niveau praticien (formation réglementaire que nous proposons aux étudiants intéressés).

Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant une formation appropriée de nos étudiants tant sur le plan pharmacologique (observation et quantification des effets de la substance étudiée) que sur le plan technique (manipulation de l'animal vigile, administration de substances chez l'animal vigile...).

Réduction : L'effectif d'une promotion est de 50 étudiants. Une séance de TP s'adresse en général à 2 trinômes d'étudiants, 8 séances (=16 trinômes +2 étudiants) sont nécessaires pour satisfaire à la formation de tous les étudiants.

Pour chaque séance, un enseignant encadrera les 2 trinômes d'étudiants. Les étudiants ayant déjà réalisé des injections par voie intrapéritonéale, aucun rat ne sera utilisé pour une démonstration par l'enseignant.

Par trinôme 6 rats seront utilisés soit 2 rats/étudiant. Chaque étudiant sera chargé du suivi d'un animal recevant le véhicule et un autre le diazepam. En effet, il est connu que lors des tests comportementaux des expérimentateurs différents peuvent obtenir des résultats différents. Les résultats seront analysés sur tous les animaux (i.e 6/groupe) de chaque séance et seront incrémentés après chaque séance.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les animaux seront réutilisés pour une deuxième séance de TP la semaine suivante, en inversant les groupes (l'animal véhicule semaine 1 recevra le diazepam semaine 2 et vice versa)

Cette réutilisation validée par le vétérinaire référent se fera selon ses recommandations.

Faisabilité : un effectif de 12 rats supplémentaires est prévu, sur toute la durée de la validation de la saisine, afin d'effectuer si besoin des améliorations ou des évolutions des protocoles en fonction de l'évolution du programme pédagogique.

Des rats mâles et femelles de notre élevage seront indifféremment utilisés pour limiter la présence d'animaux surnuméraires. Un seul sexe sera utilisé par séance, afin de tenir compte de l'effet-sexe observé dans ces tests comportementaux.

Ainsi 50 animaux/an et 250 animaux/5 ans seront nécessaires pour 250 étudiants, auxquels s'ajoutent les 12 animaux pour l'étude de faisabilité, soit 262 animaux sur 5 ans. Ce chiffre sera revu à la baisse en cas d'effectif inférieur à 250 étudiants.

Raffinement : les animaux seront hébergés par groupes socialement harmonieux dans des cages appropriées à l'espèce, en nombre adapté (4 animaux dans des cages de 1050 cm²), et en présence

d'un enrichissement comprenant 2 éléments (tunnel en plastique noir et bâtonnet en bois à ronger ou noix).

Préalablement aux séances de TP, les animaux seront habitués à la préhension et à la contention afin de limiter leur stress lors de leur utilisation par les étudiants.

Pendant tout le TP, les étudiants seront amenés à être particulièrement sensibilisés au stress pouvant être induit chez le rat par la manipulation. En effet, le stress de la manipulation est non seulement dommageable pour l'animal mais diminue également la qualité des résultats obtenus dans ce type de tests comportementaux.

17297 La fibrose cardiaque marque l'évolution vers l'insuffisance cardiaque quel que soit la nature de la cardiopathie. La fibrose a des conséquences irréversibles sur la rigidité (ou élasticité) du ventricule gauche, qui peut se traduire par l'apparition d'une insuffisance cardiaque alors même que la contractilité du myocarde n'est pas encore atteinte. En particulier, avec le vieillissement de la population, l'augmentation croissante de l'insuffisance cardiaque à fonction contractile conservée comme du rétrécissement de la valve aortique témoigne de l'incidence des anomalies de compliance et de relaxation cardiaque.

Le but de ce projet est d'évaluer un nouvel outil diagnostique appelé « élastographie » permettant d'envisager un dépistage de masse des anomalies de la rigidité (ou élasticité) du myocarde, premier pas vers une prise en charge optimisée des patients.

Nous utiliserons un lot de brebis de 40 à 50 kg chez lesquelles nous évaluerons l'impact des conditions physiologiques (fréquence cardiaque, augmentation ou diminution des conditions de charge pesant sur le fonctionnement du cœur, augmentation ou diminution de la contractilité, ...) sur la mesure de l'élasticité cardiaque en élastographie. Les mesures seront comparées à des mesures invasives effectuées à l'aide d'un capteur de pression et de volume placé dans le ventricule gauche des animaux. Toute l'expérimentation sera réalisée sous une anesthésie et une analgésie profondes pour prévenir la douleur chez l'animal. A l'issue de la procédure, le cœur sera utilisé pour analyser son architecture en Imagerie par Résonance Magnétique.

Selon la littérature, le nombre d'animaux nécessaire est de 20. Récemment, 10 animaux ont été suffisants pour montrer une différence entre infarctus et sidération myocardique. Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, une analyse intermédiaire sera réalisée après l'exploration des 10 premiers et pour toutes les suivantes, et l'étude sera arrêtée en cas de résultats significatifs.

Afin de respecter la règle des trois R, les procédures expérimentales prévues dans le cadre de cette recherche 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. Il est important de signaler ici que les manipulations sont réalisées dans une structure iso 9001. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum, selon les calculs d'effectifs effectués en s'appuyant sur des études précédentes, et des tests statistiques appropriés seront utilisés afin de mettre en évidence les résultats attendus.

Dans un souci de raffinement, le long de l'expérience, les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Mots clefs : insuffisance cardiaque, fibrose, élastométrie, module de Young, hémodynamique.

17298 L'amélioration de la médecine moderne s'est illustrée par une augmentation de l'espérance de vie. Cependant, le vieillissement est inexorablement lié à un accroissement de la fréquence des maladies liées à l'âge telles que les maladies neurodégénératives, le cancer, le diabète, l'ostéoporose et les maladies cardio-vasculaires. Ainsi, une meilleure compréhension des processus biologiques qui gouvernent le vieillissement est essentielle afin d'étendre la durée de vie en bonne santé.

Un modèle de vieillissement prématuré chez le poisson zèbre, déficient pour une protéine appelée télomérase, a récemment été caractérisé. De manière intéressante, ce modèle anticipe le vieillissement des poissons normaux à des âges plus précoces. En effet, à partir de l'âge de 9-12 mois, les poissons déficients pour la télomérase sont plus minces, montrent une réduction de leur fertilité, de leur rapidité

de mouvement, et une légère augmentation du risque d'infection et de cancer. Ces mêmes signes de vieillissement sont communément observés à partir de l'âge de 18 à 24 mois chez les poissons zèbres normaux. De plus, comme chez le poisson normal, l'intestin est un des premiers organes à vieillir chez ces poissons zèbres déficient pour la télomérase. A partir de ces observations, nous émettons l'hypothèse que l'intestin, souvent décrit comme le deuxième cerveau, est l'organe initiateur du vieillissement. Sa dégénérescence serait ainsi communiquée à tout l'organisme, ce qui affecterait la fonction d'autres organes. Pour tester cette hypothèse, nous nous proposons de réactiver la télomérase uniquement dans l'intestin de poissons zèbres déficients afin de retarder le vieillissement d'autres organes et d'augmenter la durée de vie de ces organismes. En parallèle, nous nous pencherons sur les mécanismes de communication inter-organes au cours du vieillissement.

L'évolution de la biologie et le transfert des mécanismes en pratique médicale nécessitent des approches expérimentales intégratives au niveau des organismes. Cela est particulièrement vrai pour la recherche sur le vieillissement car ce processus ne repose pas uniquement sur les propriétés propres des cellules/tissus mais également sur leurs interactions avec l'ensemble de l'organisme. Les souris ont été et resteront des modèles clefs utilisés dans la recherche sur le vieillissement. Cependant, des modèles poissons émergents offrent des avantages très importants et de nouvelles opportunités de recherche par rapport aux souris pour développer des modèles pertinents d'étude au niveau de l'organisme entier : contrôle de la fécondité, nombre de descendants élevé, développement externe, bien adapté à la manipulation des embryons et à l'imagerie *in vivo* dans l'animal entier. En plus de ces avantages, les poissons sont particulièrement prometteurs pour aborder la question du vieillissement lié au raccourcissement des extrémités des chromosomes, appelés aussi télomères. En effet, la biologie des télomères chez les poissons est plus proche de la situation humaine que celle de la souris. Comme chez l'Homme, les télomères des poissons zèbres se raccourcissent avec l'âge. De plus, contrairement à la souris, les poissons zèbres déficients pour la télomérase ont un raccourcissement plus rapide des télomères et développent prématurément des maladies associées au vieillissement de façon similaire à ce qui est observé lors de mutations humaines affectant la télomérase. Ainsi, les poissons sont aujourd'hui des modèles non seulement complémentaires aux modèles murins et cellules actuels, mais également clés pour étudier le vieillissement et ses pathologies associées.

Remplacement : Les études *in vitro* ont apportés de nombreuses avancées sur la compréhension du vieillissement de la cellule et le rôle des raccourcissements des télomères dans ce phénomène. Cependant, les modèles *in vitro* ne permettent pas d'appréhender les questions de communication entre organes. De plus, nous nous intéressons à l'étude du développement des pathologies associées à l'âge, qui est un processus au niveau de l'organisme entier, et nécessite donc l'utilisation d'animaux vivants. Nous devons utiliser un organisme modèle multicellulaire qui vieillit de la même manière que les humains, c'est à dire de manière dépendante de la taille des télomères. C'est pourquoi nous utilisons le modèle poisson.

Réduction : L'utilisation de modèles génétiques inductibles permet d'obtenir des animaux expérimentaux et témoins provenant du même croisement. Ceci garantit ainsi une identité génétique maximale, mais évite également le recours à des animaux supplémentaires servant de témoins, contribuant ainsi à la réduction du nombre d'animaux utilisés. De plus, de nombreuses analyses post-mortem seront réalisées sur différents organes à partir d'un même poisson. Ceci permettra d'optimiser les résultats obtenus à partir d'un même poisson et de ne pas nécessiter une utilisation d'animaux supplémentaires.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 3600 poissons zèbres. Le nombre d'individus nécessaire estimé s'appuie sur des expériences précédentes réalisées dans notre laboratoire et est conforté par l'utilisation d'un logiciel statistique évaluant le nombre minimum requis de poissons pour distinguer des différences entre nos conditions expérimentales.

Raffinement : Les poissons zèbres sont des animaux sociaux vivants en cohortes. Afin de diminuer le stress et/ou l'angoisse chez les poissons, ils sont élevés en groupe, (10 poissons/Litre). Les conditions d'élevage présentent également divers atouts pour l'enrichissement du milieu aquatique et le bien-être des poissons : allumage et extinction lumière de façon progressive afin de mimer le levé et coucher de soleil de leur habitat naturel ; une nourriture vivante, diversifiée et enrichie leur est donnée tous les jours pour favoriser l'expression de leur instinct de prédation et éviter les carences. Les poissons en

élevage et en expérimentation sont suivis quotidiennement à l'animalerie lors de chacun de leur nourrissage (3X/jour). Afin de diminuer quelconque stress/angoisse/souffrance/douleur chez les poissons, une grille de suivie adaptée aux poissons étudiés a été développée. Cette grille présente les caractéristiques à surveiller (nage, gonflement abdominal, rougeurs...), les points limites, ainsi que les actions réalisées afin de maintenir le bien être animal. Les phénotypes dommageables observés à partir de 12 mois dans les mutans tert (état prolongé stationnaire, arrêt de nutrition prolongée) y sont inclus comme points limites nécessitant une euthanasie aux premiers signes d'apparition de ces phénotypes. Tous les 3 jours, un suivi des poissons en expérimentation sera effectué par les expérimentateurs et appuyé par la vérification quotidienne du personnel de l'animalerie. De plus, toutes les expériences pouvant engendrer une douleur aux animaux sont réalisées sous anesthésie générale. Les manipulations sous anesthésie sont de courte durée (5-10 min).

17299 La présente demande concerne un projet d'enseignement destiné à des étudiants de 3ème année de Licence Sciences de la Vie, parcours Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire, Physiologie qui implique la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux vivants (recherche biomédicale). Le projet inclue 12 heures de travaux pratiques (TP) de la matière Physiologie Animale (de l'unité d'enseignement « Physiologies » de la licence). Pédagogiquement, ces TP permettent d'illustrer et d'aider à comprendre les cours dispensés en physiologie. Ils constituent également une première initiation à l'expérimentation animale et permettent de sensibiliser les étudiants aux notions d'éthique. Les 12 heures sont réparties en 3 séances, la première permettant à l'enseignant de présenter le contexte législatif définissant les modalités réglementaires et principes d'éthique puis de réaliser une démonstration des gestes techniques à appliquer lors des séances suivantes. Les 2 séances pratiques s'articulent sous la forme de TP pendant lesquels les étudiants vont réaliser des manipulations illustrant deux grandes parties du cours : i) La régulation nerveuse de la ventilation ; ii) La contraction du muscle lisse intestinal.

1) Remplacer: Il n'existe actuellement pas de méthodes de remplacement permettant d'acquérir le même niveau de compétences techniques, en revanche nous avons adopté une stratégie visant à réduire et raffiner nos procédures. Les animaux utilisés sont des rats Wistar adultes provenant du Service Ressources Biologiques de l'UFR. Ce projet nécessite l'utilisation d'un maximum de 450 rats sur 5 ans compte tenu du nombre de groupes de travaux pratiques (8 à 9 selon les années).

2) Réduire: La réduction du nombre d'animaux utilisés est obtenue en réalisant le travail sur des animaux (mâles et femelles) de réforme issus de lots de reproducteurs destinés à la recherche. De plus, les étudiants travaillent en binôme ou trinôme, afin également de réduire les effectifs de ce projet. Enfin, un seul animal par groupe est utilisé pour la séance de démonstration et trois animaux fournissent les tissus pour l'ensemble du groupe en ce qui concerne l'étude sur le muscle lisse (travaux pratiques de pharmacologie sur organes isolés).

3) Raffiner: Une démarche visant à améliorer les procédures est également mise en place. Les TP sont assurés par des enseignants-chercheurs habilités à expérimenter sur l'animal (niveau I, et chirurgie). La séance sur la ventilation sera assurée par deux enseignants en doublon afin de mieux suivre le déroulement des manipulations. Les enseignants veillent à ce que les animaux soient manipulés sous anesthésie et analgésie profondes tout au long des séances de TP, et un dialogue permanent est entretenu avec la cellule bien-être afin d'affiner les méthodes d'analgésie et d'anesthésie.

17300 Contexte Scientifique et médical: La toux est un symptôme prédominant dans la maladie asthmatique et pourtant, l'ensemble des mécanismes impliqués, en particulier à l'effort, reste incertains et l'un des sujets phare de la recherche médicale. La diminution du réflexe de toux durant l'effort chez le sujet normal permettrait l'adaptation des besoins de l'organisme imposés par l'effort. Cependant, dans un modèle animal de la maladie asthmatique (sensibilisé à l'ovalbumine), l'asthme empêche cette diminution du réflexe de toux à l'effort, ce qui est rétabli par une corticothérapie intraveineuse. Ceci est en faveur de l'implication de l'inflammation bronchique, et notamment éosinophile, dans la modulation des réflexes défensifs respiratoires chez l'asthmatique. La meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la toux à l'effort chez le sujet asthmatique permettra à terme une meilleure prise en charge médicale des patients.

Description des objectifs du projet : L'objectif est d'étudier l'influence d'un traitement par corticoïdes inhalés (i.e traitement reconnu de l'asthme chez l'homme) sur la modulation du réflexe de toux à l'exercice chez le lapin asthmatique. L'étude sera conduite sur 16 lapins adultes de type "néo-zélandais" sensibilisés à l'ovalbumine (modèle animal de la maladie asthmatique). Dans la mesure de la conformité avec les exigences des 3R, il n'existe pas d'étude antérieure destinée à répondre aux questions scientifiques posées dans ce protocole. Remplacement : l'étude de ce réflexe nécessite l'utilisation d'un modèle physiologique intégré qui ne peut être remplacé par des méthodes alternatives. Le modèle lapin adulte type Néo-Zélandais a été choisi car c'est un modèle animal qui présente un réflexe de toux contrairement au modèle rongeur, souris ou rat.

Réduire: Sur la base de notre expertise, un nombre maximum de 8 lapins dans chaque groupe soit au total 16 lapins sera suffisant pour faire ressortir une significativité des résultats.

Raffinement : l'hébergement se fait par 8 en box de 30000 cm² au sol nourris ad libitum. Pendant cette période les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne. Dans l'éventualité, bien que peu probable, de la survenue de signes de souffrance, de détresse ou d'inconfort réel (diminution ou arrêt de consommation alimentation ou de boisson sur 48h, perte de poids de plus de 10% en 3 jours, prostration, difficulté de déplacement, gênes respiratoires) les mesures mises en place seraient l'arrêt des expériences, isolement, surveillance accentuée. L'animal serait mis à mort en cas de persistance dans les 72 heures ou en cas d'aggravation brutale.

La sensibilisation à l'ovalbumine sera obtenue par injection intra-péritonéale d'ovalbumine suivie d'une exposition à des aérosols d'ovalbumine. Les lapins seront ensuite répartis en deux groupes : 1 groupe avec inhalation d'aérosols de corticoïdes et 1 groupe avec inhalation d'aérosols de sérum physiologique. La sensibilisation à l'ovalbumine sera vérifiée par des tests cutanés (injection sous cutanée) et la maladie asthmatique sera démontrée par des tests bronchiques (lavages broncho-alvéolaires réalisés après la mise à mort de l'animal, avec analyse microscopique des cellules bronchiques).

Pendant l'expérimentation chez l'animal anesthésié, une surveillance de la profondeur de l'anesthésie et de l'analgésie (réalisées par voie intra-veineuse) sera effectuée toutes les 15 minutes. La stimulation de la trachée se fera par un cathéter introduit chirurgicalement, provoquant une stimulation mécanique de très courte durée (50 millisecondes). Sur les membres postérieurs des lapins anesthésiés, des électrodes de surface seront placées sur la peau pour effectuer la stimulation électrique musculaire mimant l'exercice, maintenue pendant 3 minutes. Nous étudierons alors la présence d'un réflexe de toux par stimulation trachéale, sous anesthésie générale, au repos et à l'effort dans les différents groupes.

Dans le cas où notre hypothèse de travail serait vérifiée (restauration, par un traitement corticoïde inhalé, de la désensibilisation du réflexe de toux à l'exercice), nos résultats apporteront des données importantes quant au rôle d'un traitement anti-inflammatoire vis à vis de la toux à l'effort. Cela laisserait à supposer qu'à l'effort, l'administration de corticoïdes inhalés est susceptible de modifier les réflexes de défense respiratoire. Ces résultats permettront une meilleure compréhension du fonctionnement de la maladie asthmatique, ouvrant la porte à des traitements plus adaptés, permettant une amélioration de la qualité de vie de nos patients. Dans le cas où notre hypothèse ne serait pas vérifiée, cela remettrait en question le rôle des corticoïdes dans la modulation du réflexe de toux à l'effort, et permettrait donc de nous orienter vers une hypothèse différente.

17301 Les Leucémies Aigues Lymphoblastiques T (LAL-T) sont des cancers très agressifs. Ce sont des pathologies rares avec 200 nouveaux cas par an en France. Malheureusement les rechutes restent fréquentes et sont habituellement fatales justifiant la recherche de nouvelles cibles d'intervention thérapeutique.

Nous avons identifié une nouvelle cible moléculaire dérégulée dans les LAL-T et en collaboration avec un groupe de chimistes nous avons synthétisé des dérivés qui bloquent cette cible. Nous avons caractérisé *in vitro* ces dérivés en étudiant leurs effets anti-leucémiques vis à vis de lignées humaines et murines de LAL-T, mais aussi leur éventuelle toxicité vis à vis de cellules saines. Nous pouvons maintenant passer à l'étape suivante qui est la validation *in vivo* de ces molécules. Pour cela nous

souhaitons mettre au point un modèle de LAL-T chez la souris immunodéficiente NSG par injection intraveineuse de cellules leucémiques humaines. Puis dans un deuxième temps nous testerons dans ce modèle l'activité anti-leucémique de nos deux meilleurs composés sélectionnés *in vitro*.

Pour satisfaire au raffinement, les animaux sont hébergés dans un milieu enrichi en portoirs ventilés avec un suivi journalier. Les souris immunodéficientes seront manipulées dans des conditions stériles. 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, il n'existe malheureusement pas de méthodes alternatives aux études précliniques en cancérologie. Toute fois 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 228 souris NSG produites au laboratoire.

17302 Le cortex cérébral contrôle la perception sensorielle ainsi que les fonctions motrices et cognitives (mémoire, pensée, réflexion...) 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. Il est également de plus en plus reconnu que l'élimination de certains types de cellules neuronales après la naissance est un processus essentiel pour le développement du cortex cérébral. Le maintien de ces cellules au stade adulte chez l'homme est associé à diverses malformations corticales (polymicrogyrie et dysplasie focal corticale) associées ou non à des crises d'épilepsie.

A cet égard, les cellules de Cajal Retzius (CR) sont un exemple remarquable. Les CR jouent un rôle clef dans différents aspects du développement cortical tels que la migration neuronale et la mise en place des aires corticales. Les CR sont divisés en 3 sous-populations selon leur origine : celles provenant du Septum, de l'Hem et de la PSB (Pallial-Sub-pallial Boundary) qui sépare le pallium (dorsal) du sous-pallium (ventral). Les CR subissent une étape de mort programmée massive à la fin du développement entre 4 jours et 10 jours après la naissance des souris et une infime minorité d'entre elles sont encore présente dans le cortex chez la souris après 24 jours.

Nos travaux ont impliqué l'apoptose dépendante de Bax comme étant seulement responsable de la mort d'une fraction de ces cellules.

Ce projet vise à identifier d'autres voies dont celle relayée par mTOR impliquées dans la survie cellulaire grâce à l'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiés. Durant les 3 années que dure ce projet nous allons utiliser au total 595 animaux nouveaux-nés et jeunes adultes sur lesquels nous réaliserons cinq procédures comprenant l'amplification des lots, des études de comportement et de sensibilité aux crises d'épilepsie induites par injection d'une substance chimique et finalement des études histologiques sur le cerveau de ces animaux.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement du cortex cérébral qui se forme de manière très similaire aux autres mammifères et qui ne peut pas être recréé par des approches *in vitro*. De plus, l'utilisation d'un modèle par des approches d'inactivation génétique est indispensable à la réalisation de ce projet et ne peut pas être réalisé chez d'autres espèces que la souris étant donné la nécessité de croiser des lignées murines déjà établies par ailleurs.

Toutefois, dans le respect de la règle des « 3R » (remplacer, réduire, raffiner), 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 un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement et par l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques lors de la procédure opératoire pour les études histologiques.

A terme, les résultats de ces travaux pourront nous permettre de mieux comprendre le rôle des cellules d'intérêt dans le développement cortical chez la souris mais aussi d'appréhender leur importance dans l'apparition d'épilepsie et de pathologies neurologiques chez l'homme.

17303 Les complications cardiovasculaires représentent l'une des premières causes de morbi-mortalité chez les patients âgés. Elles conduisent, entre autres, à des pathologies ischémiques telles que l'ischémie du membre inférieur et l'accident vasculaire cérébral (AVC). Dans ces pathologies, un défaut de formation des néovaisseaux est constaté. Un précédent projet a mis au point : 1) un modèle de vieillissement vasculaire secondaire à un désordre métabolique, 2) un traitement protecteur du réseau artériel vis-à-vis de l'installation du vieillissement métabolique. L'effet protecteur de l'inhibition d'une protéine dans l'endothélium dans un modèle d'ischémie du membre inférieur a ainsi été démontré. L'objectif de cette nouvelle étude est d'explorer, chez des souris âgées de 6 mois (422 souris au total), l'effet protecteur de l'inhibition de cette même protéine dans une autre pathologie, l'AVC ischémique. Le traitement protecteur sera administré à des souris par voie systémique. Il consiste à injecter des nanoparticules porteuses d'ARN inhibiteurs ciblant une protéine dans l'endothélium. Les souris seront suivies de façon longitudinale tout au long de l'étude et ce dès le début du vieillissement métabolique et artériel induit par un régime riche en protéines et en lipides et pauvre en glucides. Après 3 mois de ce régime couplé au traitement, nous mimerons l'AVC ischémique en utilisant un modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale. Ce projet d'une durée de 5 ans sera réalisé en conformité avec la règle des 3R.

Remplacement : après des premières étapes montrant l'intérêt d'éteindre cette protéine de l'endothélium dans un modèle de culture primaire de cellules isolées de sang de cordon humain, le projet a pour but maintenant d'étudier l'ischémie cérébrale, qui met jeu des mécanismes à l'échelle de l'organisme entier. Il nécessite donc l'utilisation d'animaux vivants puisque l'étude des conséquences métaboliques du vieillissement et de son retentissement sur le vaisseau et sa fonctionnalité, avec ou sans traitement, ne peut s'envisager que dans un organisme entier.

Réduction : 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. Le choix s'est porté sur la souris qui est un modèle reconnu pour reproduire la pathologie humaine de l'AVC.

Raffinement : afin de prévenir toute douleur qui pourrait être associée au modèle, les animaux recevront un traitement antalgique en pré- per- et post-opératoire. Un suivi clinique et une surveillance des animaux seront réalisés à l'aide d'une grille de score avec la mise en place de points limites. Tout animal présentant des signes de souffrance sera pris en charge et/ou euthanasié selon le score.

Ce travail permettra de montrer l'effet protecteur de l'inhibition de cette protéine au niveau de l'endothélium cérébral et de la proposer comme cible thérapeutique pour les patients à risque d'AVC.

17304 Le nombre de cancers cutanés est en constante augmentation, les plus fréquents étant les carcinomes cutanés et les plus dangereux étant les mélanomes du fait de leur fort potentiel métastatique. Le principal traitement consiste en l'exérèse chirurgicale dont la rançon cicatricielle dépend beaucoup de la localisation et du stade du cancer. Les autres alternatives sont l'utilisation de la photothérapie dynamique et des crèmes de type imiquimod ou 5-FU. Ces derniers traitements sont limités aux carcinomes baso-cellulaires et épidermoïdes superficiels. Ils présentent une douleur à l'application ou par la suite avec des irritations pouvant conduire à un arrêt précoce de leur utilisation. Nous sommes actuellement en train de développer un traitement alternatif qui consiste à détruire les lésions par hyperthermie grâce à des nanoparticules d'or et une irradiation laser = photothermie plasmonique. Ce traitement a été testé sur des lignées tumorales en culture et une activité antitumorale a pu être observée. Deux études d'efficacité ont également été réalisées chez la souris et ont permis de démontrer une efficacité du traitement. Cependant les paramètres du traitement (quantité de nanoparticules et puissance laser utilisées) nécessitent encore d'être optimisées et c'est le but de cette étude. Ainsi deux concentrations de nanoparticules associées à 3 puissances laser seraient testées de manière à définir l'association la plus efficace. Ces traitements seront testés sur des souris femelles C57Bl6 auxquelles auront été greffées des cellules de mélanomes murins (B16), à raison de 5 souris par lots, cela correspondra à 35 souris en incluant un lot contrôle non traité. Les NP seront injectées aux souris lorsque le volume tumoral sera de l'ordre de 100mm³

Respect de la règle des 3R

- Réduction : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au strict minimum nécessaire pour avoir des résultats statistiquement significatifs. Les conditions à tester ont pu être limitées grâce aux études précédemment réalisées.

- Raffinement : Lors de l'irradiation les souris seront anesthésiées par voie gazeuse et un analgésique sera injecté quelques minutes avant l'irradiation au cas où l'hyperthermie engendrerait une douleur. Par ailleurs, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

- Remplacement : des études *in vitro* ont été réalisées en amont pour démontrer l'efficacité d'un tel traitement mais le microenvironnement tumoral étant plus compliqué que de simples cellules en culture il est nécessaire de passer sur des modèles *in vivo*.

Domages/Avantages : L'étude sur ce nombre restreint d'animaux permettra de définir les paramètres optimaux pour le traitement par photothermie et ainsi orienter les essais de phase I prévus l'année prochaine chez l'homme. Cette étude est par ailleurs requise pour compléter le dossier à déposer à l'ANSM.

17305 Les dispositifs médicaux doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité afin d'évaluer leur biocompatibilité selon la stratégie de tests définie dans la norme ISO 10993-1. De nombreuses entreprises développent aujourd'hui des dispositifs médicaux biodégradables. Il est important de comprendre la vitesse et le mécanisme de dégradation afin d'assurer le maintien des performances du dispositif pendant la durée nécessaire à la régénération du site chirurgical visé. Plusieurs modèles de dégradation *in vitro* sont indiqués dans l'ISO 10993 et peuvent être utilisés pour modéliser la vitesse de dégradation. Ces modèles *in vitro* sont un bon moyen de diminuer le nombre d'animaux utilisés en affinant le plus possible la cinétique de dégradation du dispositif pour mieux sélectionner ensuite la durée des études à effectuer *in vivo* mais ne remplacent pas totalement les tests *in vivo*.

L'obtention de cette information sur le temps de dégradation d'un dispositif médical est importante à deux niveaux: garantir l'efficacité du dispositif mais aussi garantir la sécurité du patient, en ciblant correctement la durée des études de biocompatibilité qui devront être effectuées avant que le dispositif ne soit autorisé pour sa mise sur le marché. En effet, la norme ISO 10993-6 précise que pour les matériaux absorbables, la durée d'essai doit être en rapport avec la durée de dégradation estimée du produit étudié. Il convient que les intervalles d'étude s'étendent sur une portion significative de la durée de dégradation de l'implant. Les intervalles d'étude doivent inclure, au minimum, les périodes suivantes: intervalle initial (lorsqu'il n'y a pas de dégradation ou une dégradation minimale, ce qui correspond généralement à un intervalle d'étude entre 1 semaine et 2 semaines après l'implantation pour évaluer la réponse tissulaire précoce) ; intervalle intermédiaire (lorsque la dégradation se produit) et intervalle final (lorsque l'implant est essentiellement absorbé).

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 35 (jeunes adultes, tel que défini dans la norme).

Les animaux seront analgésiés et anesthésiés avant toute procédure chirurgicale. La qualité du réveil sera appréciée pour détecter toute anomalie potentielle de la procédure anesthésique. Si des signes de douleur sont présents, un traitement analgésique sera administré.

Par ailleurs, les animaux sont hébergés autant que possible en groupes et un enrichissement (tunnels en carton) est ajouté à leur environnement.

Pour l'ensemble des procédures expérimentales, des points limites ont été définis pour limiter toute souffrance.

Des échantillons représentatifs du dispositif médical seront implantés en sous-cutané chez le rat (5 rats sont inclus dans l'étude par temps de prélèvement, le nombre total de rats varie en fonction du nombre de temps de prélèvements à effectuer. Un maximum de 7 temps de prélèvements a été déterminé afin de couvrir une période allant de 1 mois à 1 an.)

Ce modèle classique est adapté de l'ISO 10993-6 qui décrit les implantations sous-cutanées chez le rat dans le but d'évaluer la tolérance locale. Le protocole de ces études sera donc exactement le même

en terme d'animaux, de chirurgie, de protocole d'analgésie. Seul l'examen final sera modifié puisqu'il s'agira d'évaluer la quantité restante du dispositif et non pas d'évaluer une réaction tissulaire. Ce test consiste à implanter chez le rat, en sous-cutané, le dispositif médical ou un échantillon représentatif de ce dernier. La durée de la période d'observation qui suit dépend des données des études de dégradation réalisées *in vitro*. Pendant toute la période d'observation, les animaux seront régulièrement pesés, les sites d'implantation observés pour l'éventuelles apparition de réactions d'intolérance. Des observations cliniques sur l'état général des animaux seront également conduites. A la fin de la période d'implantation, les animaux sont euthanasiés et les dispositifs seront explantés à des temps différents prédéterminés par les données provenant des études *in vitro* déjà réalisées sur ces dispositifs. Une comparaison sera faite entre le poids du dispositif après prélèvement et le poids initial le jour de l'implantation. Un examen visuel qualitatif de l'implant sera également effectué. Ces données permettront de valider la cinétique de dégradation du dispositif médical et également de valider les modèles *in vitro* qui pourront ensuite être utilisés seuls pour déterminer la cinétique de dégradation de dispositifs similaires.

17306 Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase primaire, processus physiologique permettant l'arrêt des saignements. Elles sont de petite taille (2 μm de diamètre environ) et circulent sous forme discoïde. Cette morphologie est soutenue par un anneau de microtubules (MT) que l'on appelle bande marginale. Certaines pathologies s'accompagnant d'une perte de la forme discoïde sont liées à des anomalies de certains types de tubuline, les constituants des microtubules. Notre projet vise à étudier le rôle de certaines tubulines dans le mécanisme unique d'assemblage des MT dans la bande marginale des plaquettes et à terme d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients présentant des maladies plaquettaires.

L'étude de patients et de souris inactivées ont montré que l'absence de tubuline beta1 perturbait la formation de la bande marginale. Plus récemment un modèle de souris mutées sur la tubuline alpha4A a également montré un défaut de formation de cette bande marginale. Ces résultats suggèrent que l'hétérodimère de tubuline alpha4Abeta1 est un élément essentiel dans la formation de cet anneau de microtubules lors de la biogenèse des plaquettes sanguines. Nous nous proposons d'étudier l'effet de l'absence combinée de ces deux isotopes de tubuline sur la production des plaquettes et sur leurs propriétés fonctionnelles. Les expériences consisteront dans un premier temps en la génération d'une souche de souris invalidées pour ces 2 tubulines, puis en des prélèvements de sang pour réaliser, des numérations plaquettaires, l'évaluation *ex vivo* de la biologie et de la morphologie des plaquettes et de leur réactivité. La capacité de ces souris mutées à stopper un saignement sera mesurée par le temps de saignement suite à une coupure au niveau de l'extrémité de la queue de l'animal. Nous serons attentifs à être en adéquation avec la règle des 3R.

Réduction. Une même souris sera utilisée pour plusieurs types d'expériences et comme nous maîtrisons l'ensemble des techniques mises en œuvre dans ce projet, aucune mise au point préalable n'est nécessaire. Le nombre d'animaux utilisés pour cette étude est calculé au plus près afin de permettre une analyse statistique des données (test de Student).

Remplacer. Les plaquettes étant des éléments anucléés, elles ne sont pas manipulables génétiquement. L'utilisation de souris est donc incontournable pour les isoler.

Raffinement. Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés et un traitement approprié contre la douleur leur est administré. Les points limites adaptés ont été établi pour soustraire l'animal à la souffrance. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton compressé 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. Après une procédure, une attention particulière sera portée au réveil des animaux et l'enrichissement des cages sera augmenté afin d'être mieux adapté.

L'étude nécessitera 156 souris pour générer les doubles mutants et 112 souris pour l'étude soit 268 au total.

[AVENANT] Pour compléter les études de la biologie et de la morphologie des plaquettes et de leur réactivité, l'étude nécessitera 240 souris supplémentaires, soit 508 souris au total (268 + 240 souris supplémentaires). Les bénéfices apportés par l'étude seront une meilleure compréhension du rôle des tubulines dans les fonctions plaquettaires. Plus spécifiquement, les résultats trouveront une application directe dans le domaine médical. En effet, les gènes des tubulines ici étudiées pourraient, à terme, être ajoutées dans la liste de gènes habituellement séquencés lors de travaux à visée exploratoires dans des cas de maladies congénitales plaquettaires non diagnostiquées.

17307 Les complications cardiovasculaires représentent l'une des premières causes de morbi-mortalité chez les patients âgés. Elles conduisent, entre autres, à des pathologies ischémiques telles que l'ischémie du membre inférieur et l'accident vasculaire cérébral (AVC). Dans ces pathologies, un défaut de formation des néovaisseaux est constaté. Un précédent projet a mis au point : 1) un modèle de vieillissement vasculaire secondaire à un désordre métabolique, 2) un traitement protecteur du réseau artériel vis-à-vis de l'installation du vieillissement métabolique. L'effet protecteur de l'inhibition d'une protéine dans l'endothélium dans un modèle d'ischémie du membre inférieur a ainsi été démontré. L'objectif de cette nouvelle étude est d'explorer, chez des souris âgées de 6 mois (422 souris au total), l'effet protecteur de l'inhibition de cette même protéine dans une autre pathologie, l'AVC ischémique. Le traitement protecteur sera administré à des souris par voie systémique. Il consiste à injecter des nanoparticules porteuses d'ARN inhibiteurs ciblant une protéine dans l'endothélium. Les souris seront suivies de façon longitudinale tout au long de l'étude et ce dès le début du vieillissement métabolique et artériel induit par un régime riche en protéines et en lipides et pauvre en glucides. Après 3 mois de ce régime couplé au traitement, nous mimerons l'AVC ischémique en utilisant un modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale. Ce projet d'une durée de 5 ans sera réalisé en conformité avec la règle des 3R.

Remplacement : après des premières étapes montrant l'intérêt d'éteindre cette protéine de l'endothélium dans un modèle de culture primaire de cellules isolées de sang de cordon humain, le projet a pour but maintenant d'étudier l'ischémie cérébrale, qui met jeu des mécanismes à l'échelle de l'organisme entier. Il nécessite donc l'utilisation d'animaux vivants puisque l'étude des conséquences métaboliques du vieillissement et de son retentissement sur le vaisseau et sa fonctionnalité, avec ou sans traitement, ne peut s'envisager que dans un organisme entier.

Réduction : 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. Le choix s'est porté sur la souris qui est un modèle reconnu pour reproduire la pathologie humaine de l'AVC.

Raffinement : afin de prévenir toute douleur qui pourrait être associée au modèle, les animaux recevront un traitement antalgique en pré- per- et post-opératoire. Un suivi clinique et une surveillance des animaux seront réalisés à l'aide d'une grille de score avec la mise en place de points limites. Tout animal présentant des signes de souffrance sera pris en charge et/ou euthanasié selon le score.

Ce travail permettra de montrer l'effet protecteur de l'inhibition de cette protéine au niveau de l'endothélium cérébral et de la proposer comme cible thérapeutique pour les patients à risque d'AVC.

17308 Ce projet de recherche en conservation vise à présenter des solutions de remédiation pour réduire la prédation des cultures vivrières par le lémur de Mayotte (*Eulemur fulvus*), compatibles avec la préservation de cette espèce protégée par les conventions internationales. Les exploitations à Mayotte sont petites, nombreuses et produisent des ressources vivrières assurant la sécurité alimentaire des familles. Mais l'accroissement rapide de la population humaine associé à la déforestation et la fragmentation des milieux forestiers intensifie les interactions avec la faune sauvage, notamment avec les espèces frugivores. Cette concurrence s'avère particulièrement marquée avec le lémurien, primate frugivore protégé et emblématique de la conservation sur l'île, dont la plupart des populations sont devenues quasi-commensales de l'homme. Selon les cultivateurs locaux, la faune sauvage est devenue « nuisible ». Pour élaborer des recommandations utiles à la diminution du conflit homme-faune sauvage, ce programme interdisciplinaire (sciences biologiques/sciences humaines), portant sur les fragments d'aires protégées et les zones boisées non protégées de Mayotte, nécessite de connaître l'alimentation, les déplacements, la condition physique, les apports et besoins énergétiques du lémur, de même que sa densité de population et sa fécondité ; d'évaluer les prélèvements dans les cultures

vivrières par les nombreux groupes en lisière des réserves forestières et leurs conséquences sur le bilan énergétique, l'écologie et la socialité du lémur ; et de dégager les ancrages culturels qui permettront aux institutions locales d'articuler les actions de préservation de l'espèce dans le respect des pratiques agricoles et des conventions de protection.

Il est indispensable de déterminer si toute limitation de l'accès aux ressources d'origine anthropique (pour protéger les petits cultivateurs) risque d'impacter le bilan énergétique du lémur au point d'être préjudiciable à sa survie et sa reproduction. Réciproquement, il est nécessaire d'évaluer si la consommation des aliments cultivés — qui réduit d'autant son rôle majeur dans la bonne dispersion et la régénération des végétaux autochtones —, est associée à un surcroît d'énergie, une condition physique et une fécondité accrues. Si une densité importante de lémuriens semble potentiellement favorable à la conservation, elle peut aussi transformer la taille et la composition des groupes, la socialité (relations de dominance, flux géniques), augmenter la sévérité des conflits (compétition alimentaire ou sexuelle), et favoriser la transmission de pathogènes par contacts (y compris avec l'humain).

Notre but est donc de trouver un compromis entre conservation biologique et sécurité alimentaire : déterminer quel accès aux ressources cultivées permet aux nombreux groupes de lémurs de pallier aux fluctuations de leurs ressources naturelles (eg, raréfaction saisonnière typique) et assurer leur survie, tout en restant peu préjudiciable et socialement acceptable pour les cultivateurs.

En physiologie de la conservation, une seule méthode rigoureuse standardisée (l'eau doublement marquée) permet de chiffrer précisément les besoins caloriques quotidiens et la condition physique d'un animal sauvage. Son utilisation permettra d'évaluer la contribution énergétique des ressources cultivées au bilan énergétique total du lémur (entrées vs sorties énergétiques) à deux saisons distinctes. On mesurera la composition corporelle et la dépense énergétique totale individuelles, on évaluera si ces deux paramètres varient saisonnièrement, et on recherchera les différences de bilan énergétique mâles/femelles. Nous évaluerons ici à quel point les ressources cultivées sont essentielles au maintien d'une bonne condition nutritionnelle et sanitaire à différentes saisons.

Pour calculer la dépense énergétique totale *in natura*, la méthode de l'eau doublement marquée sera effectuée en saison humide (session d'1 mois) puis en saison sèche (session de 3 semaines), en association avec le suivi du comportement, de la végétation, et du climat. La procédure est complétée par la pose de colliers émetteurs enregistreurs et le suivi quotidien continu à vue des groupes pour détailler le budget d'activité et la prise alimentaire.

Vingt-quatre adultes (12 mâles et 12 femelles non gestantes non allaitantes de 6 groupes) sont capturés en saison humide par télé-anesthésie (pistolet hypodermique) pour la prise de sang, les mesures morphométriques et l'injection d'eau marquée sous anesthésie générale. Ils sont relâchés le jour de la capture, puis sont recapturés quatre jours plus tard pour une simple prise de sang afin de calculer (au laboratoire) la cinétique de disparition des marqueurs reflétant l'activité métabolique, la physiologie et le comportement de l'animal. Une seconde session de capture/recapture à la saison sèche est organisée avec la même procédure, en se limitant aux mêmes individus mâles (voir ci-dessous). Les colliers sont ôtés à l'issue de l'expérimentation et un bilan de santé est effectué par les vétérinaires.

Remplacement : Dans la problématique de conservation du lémur à Mayotte, nous analysons le comportement et la physiologie d'un organisme de l'espèce ciblée en interaction avec son milieu naturel. Il n'y a pas de remplacement possible de la technique de l'eau marquée par des moyens *in silico* ou *in vitro*, et une mesure métabolique en captivité n'aurait pas d'intérêt car n'exprimant pas les dépenses énergétiques réelles pour la survie dans l'île (liées aux déplacements, à la température ambiante).

Réduction : Le nombre d'individus requis s'appuie sur une étude statistique prospective et notre expérience de la variabilité inter-individuelle de dépense énergétique chez les lémurs. Le suivi longitudinal des mâles à 6 mois d'intervalle (associé à un collier identifiant) permet d'accroître la puissance statistique.

Raffinement : Pour éviter l'impact de la procédure sur la reproduction de cette espèce à cycle saisonnier, l'étude des femelles portera sur des individus non gestants non allaitants. La douleur et le

stress de procédure sont minimisés par l'usage d'anesthésiques et d'analgésiques. Un suivi anesthésique est réalisé par un vétérinaire, avec enregistrement de la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire et la température rectale. Pendant leur phase de réveil, les individus sont maintenus en cages conventionnelles au calme (quelques heures, le temps d'assurer une récupération suffisante avant le relâcher). La procédure expérimentale s'accompagne d'un suivi attentif individuel afin de s'assurer du bon état de santé et anticiper un excès de stress. Des indicateurs comme la prostration et des comportements auto-dirigés sont particulièrement suivis. Après le premier relâcher, le suivi par observation et colliers émetteur/enregistreur permet de noter toute anomalie comportementale majeure. Avant que les signes (comportementaux et physiologiques) ne deviennent critiques, l'animal est sorti de la procédure.

17309 Le médulloblastome (MB) est la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente chez l'enfant et représente 20 % des tumeurs du système nerveux central. Le MB se développe dans le cervelet, partie de l'encéphale coordonnant le mouvement, l'équilibre et la posture. Le MB est une tumeur rare chez l'adulte et 70 % des MB sont diagnostiqués chez des enfants de moins de 10 ans. Au moment du diagnostic, près de la moitié des enfants présentent des métastases rarement symptomatiques. Le traitement conventionnel du MB implique une résection chirurgicale, de la radiothérapie et une chimiothérapie. Cette combinaison thérapeutique conduit à une survie à 5 ans de 70 %. Cependant, la plupart des patients souffrent d'effets secondaires à long terme et la rechute est fatale dans tous les cas. Les enjeux actuels sont de proposer des agents moins toxiques et des thérapies innovantes en cas de rechutes. L'avènement du théranostique en médecine nucléaire peut conduire à des soins plus efficaces et moins toxiques. Le laboratoire a précédemment validé un radiotraceur ciblant une protéine surexprimée dans les tumeurs pour l'imagerie (molécule marquée avec un émetteur de positron permettant de suivre la biodistribution du composé à l'aide de caméras dédiées) et la thérapie (molécule marquée avec un émetteur beta - pour le ciblage thérapeutique des tumeurs) des tumeurs du cerveau, dans des modèles de xénogreffes sous-cutanée chez la souris. Le but du présent projet est de réaliser l'imagerie des MB et la thérapie dans des modèles de souris de xénogreffes orthotopiques, c'est-à-dire sur un modèle où la tumeur est localisée au niveau cérébral, afin de se rapprocher au maximum de la situation clinique. Ce projet est réalisé dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire qui sera responsable de la mise au point des modèle d'étude. La présente demande concerne donc l'évaluation de l'agent théranostique. Les études seront réalisées chez des souris (112 animaux). 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 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.

17310 Dans ce projet nous allons étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour la glycogénose de type III (GSD III).

GSD III est une maladie rare caractérisée par une dégénérescence progressive du foie et des muscles. La fréquence de la maladie est de 1/100000. GSD III est une maladie autosomale récessive due à l'absence de l'enzyme de débranchement du glycogène (GDE), enzyme clé dans la dégradation du glycogène, molécule de stockage du glucose.

La maladie se présente en deux phases successives : une phase juvénile puis une phase adulte. Les malades présentent un élargissement du foie (hépatomégalie), une hypoglycémie, une hyperlipidémie et un retard de croissance. Chez l'enfant la GSDIII affecte principalement le foie. Sans un régime alimentaire approprié les conséquences sont fatales. Avec l'âge les symptômes évoluent. Chez l'adulte, la maladie a principalement un phénotype musculaire dégénératif alors que le phénotype hépatique s'estompe. Néanmoins, dans les cas les plus sévère, les patients adultes peuvent développer une cirrhose qui conduit à l'apparition d'adénomes hépatiques et de carcinomes, nécessitant une transplantation.

Actuellement, il n'y a pas de traitement pour le phénotype musculaire de la GSDIII mais un régime riche en glucides complexes et en protéines peut ralentir l'évolution de la myopathie.

Le but de notre projet est de développer une approche de transfert de gène permettant aux cellules des patients atteints de GSDIII de recréer la protéine GDE manquante. Cette approche vise aussi bien les enfants (phénotype métabolique) que les adultes (phénotype musculaire).

Afin de respecter la règle des trois R, tous nos virus médicament ont préalablement été testés *in vitro* (Réduction) et seuls ceux ayant montré l'expression de la protéine GDE la plus importante seront utilisés *in vivo*. Toutefois la capacité de nos virus à franchir les défenses immunitaires et à induire une correction concomitante des muscles et du foie ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier", rendant l'utilisation du modèle animal indispensable. Nous prévoyons donc de les tester chez le modèle animal murin qui mime le phénotype musculaire et métabolique de la maladie. Nous prévoyons ainsi de tester nos hypothèses thérapeutiques sur un modèle de souris (souris GDE-KO) présentant les mêmes déficiences que celles observées dans les patients atteints de GSDIII. Les souris AGL souffrent d'une dégénération progressive des muscles, ce qui induit une perte de force musculaire graduelle détectable avec des tests fonctionnels (comme le wirehang test). Au niveau hépatique, les souris AGL souffrent d'une hépatomégalie qui au contraire de l'homme ne s'améliore avec le temps mais qui n'a pas d'influence sur leur santé car elles ne souffrent pas, à l'inverse de l'homme, de crises d'hypoglycémies sévères. Néanmoins, la glycémie de ces souris est bien diminuée tout au long de leur vie.

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). Nous envisageons ainsi l'utilisation d'un total de 170 souris sur 5 ans. 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.

Les prélèvements sanguins seront importants pour évaluer l'efficacité de nos vecteurs et seront fait sous anesthésie gazeuse afin de limiter le stress chez les animaux (Raffinement).

Nous espérons ainsi montrer au terme du projet une efficacité thérapeutique de notre meilleur candidat chez la souris permettant la preuve de concept de thérapie génique pour GSDIII. Nous espérons aussi montrer que la séquence humaine est efficace et permettra d'initier un développement clinique de notre produit.

17311 Ce projet a pour objectif l'évaluation de l'activité des vaccins et des médicaments immunogènes destinés à l'Homme, selon les normes d'innocuité et de sécurité réglementaires. Ce projet inclut également la calibration/validation des solutions antigéniques utilisées dans ces tests et requise par les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Ces tests consistent à immuniser les animaux avec les produits à tester puis les héberger durant la période nécessaire au développement de l'immunité. Une épreuve infectieuse est ensuite réalisée pour déterminer le niveau de protection des animaux contre les effets de la toxine ou du virus.

Ce projet représente l'ensemble des essais menés sur chaque lot de produits fabriqués. Les espèces employées sont la souris et le cobaye.

Suite à l'épreuve infectieuse les animaux peuvent présenter des signes cliniques. Des points limites spécifiques sont définis.

La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques non attendus est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 414000 souris et 151350 cobayes pour une durée de 5 ans.

Les bénéfices attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de qualification du personnel pour la procédure n°1.

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux est euthanasiée selon les méthodes recommandées réglementairement, par le Comité de Protection

Animale. En l'absence de signes cliniques, des animaux peuvent être réutilisés pour formation dans le respect des exigences réglementaires.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Les tests d'activité des vaccins et produits immunogènes sont réalisés sur animaux lorsque la réglementation l'impose. Des efforts de remplacement sont en cours pour rassembler différents tests d'activité en un seul test d'immunogénicité. Certains tests sont en cours de remplacement par des tests *in vitro* de type ELISA.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période considérée.

Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation ou par une étude statistique. Il ne peut être réduit au-delà. En revanche, une optimisation visant à réduire le nombre de groupes témoins est pratiquée aussi souvent que possible. Suite à une analyse statistique précise des résultats, le nombre d'animaux utilisés pour le test d'activité de la tuberculine purifiée a pu être diminué. Suite à une optimisation des séries pour le test d'activité tétanique le nombre d'animaux témoins et référence a été réduite de 12%

Raffinement : Pour certains tests d'activité, des tests d'immunogénicité sont en cours de développement lorsqu'il n'est pas possible de supprimer l'utilisation de l'animal.

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé.

En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

17312 En Europe, le traumatisme crânien (TC) est la première cause d'invalidité et de mort chez les enfants. Le TC résulte de l'application d'une force mécanique externe et soudaine entraînant des lésions cérébrales. Selon la sévérité des lésions cérébrales, le TC est classé en 3 catégories : léger, modéré et sévère. Plus de 70% des TC sont modérés et ne portent pas atteinte à la vie alors qu'un TC sévère peut engendrer un handicap permanent ou la mort de l'individu.

Chez les enfants, un TC modéré peut entraîner de nombreuses séquelles perturbant la vie quotidienne. Ces séquelles peuvent avoir un impact sur la parole, la compréhension, la coordination des mouvements, l'humeur ou les capacités de raisonnement et de mémorisation. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant aux altérations sur le long terme de ces zones éloignées sont toujours méconnus. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de tels désordres à la suite d'un TC modéré.

Suite à un dommage cérébral, les astrocytes, connus pour jouer un rôle essentiel dans la transmission nerveuse, sont un des premiers types cellulaires à réagir en modifiant leur fonction. En particulier, des études chez la souris montrent que suite à un TC modéré l'expression de l'aquaporine 4 (AQP4), protéine impliquée dans la régulation de la quantité d'eau dans le cerveau, est modifiée. Ces modifications peuvent affectées les échanges d'eau entre les cellules cérébrales et le milieu extracellulaire et par conséquent impacter le fonctionnement physiologique des synapses (connections entre neurones). De manière intéressante, pendant la phase de récupération d'un TC, le niveau d'expression et la localisation de l'AQP4 est rétabli. Ces observations suggèrent que l'AQP4 joue un rôle important dans la modification de l'espace extracellulaire induit par un TC. Curieusement, il a été démontré qu'une activité physique suite à un TC pouvait significativement améliorer les résultats cliniques.

Cependant les mécanismes permettant cette récupération sont encore mal connus. Notre projet vise à comprendre chez la souris le rôle essentiel que joue l'AQP4 sur le remodelage du cerveau après un traumatisme crânien modéré mais aussi pendant la phase de récupération.

Nous souhaitons ainsi :

(1) étudier l'impact du TC sur le fonctionnement des synapses, sur le niveau d'expression de l'AQP4 dans les astrocytes ainsi que l'évolution de l'espace extracellulaire au cours du temps.

(2) étudier l'impact de l'activité physique sur ces différents paramètres

(3) démontrer que l'AQP4 est essentielle à la récupération du fonctionnement des synapses et donc des capacités physiques et comportementales.

Pour l'ensemble de l'étude, nous combinerons deux techniques complémentaires d'imagerie de pointes, l'IRM à la microscopie à super-résolution, couplées à des études comportementales. Dans ce projet, 240 souris seront utilisées dont 120 souris C57Bl6 et 120 souris transgéniques.

Dans le but de garantir au mieux le respect du bien-être animal, toutes les procédures expérimentales utilisées dans ce projet ont été conçues dans la lignée de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement). L'objectif de ce projet étant de caractériser le lien entre les modifications morphologiques et l'altération des fonctions des synapses et de l'espace extracellulaire, cette étude ne peut être réalisée de manière pertinente avec des modèles *in silico* ou *in vitro*. L'utilisation de l'imagerie chronique permet de réduire le nombre d'animaux, en imageant un même animal à différents temps. L'anesthésie lors des chirurgies ou des séances d'imagerie sera faite avec les molécules les plus adaptées. La qualité de la mise en œuvre des procédures (expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de prendre en compte, avec le plus grand soin, le confort de l'animal.

L'ensemble des mesures détaillées ci-dessus nous permet de veiller de façon optimale sur le bien-être des animaux de leur naissance à leur sacrifice pour des besoins expérimentaux. Les animaux seront hébergés selon les standards prévus par la réglementation européenne : en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi : matériel de nidification, rouleau en carton et barre à ronger. Le sevrage ne sera réalisé qu'au 25^{ème} jour post-natal, cette procédure limitant le stress du sevrage. Les animaux seront observés une (avant traumatisme) à deux fois (après traumatisme) par jour minimum afin de s'assurer de leur bien-être au sein de la colonie.

17313 L'acide rétinoïque (ATRA) est essentiel car c'est une vitamine. Notre recherche consiste à comprendre les mécanismes que l'ATRA contrôle pour exercer ses effets. Le testicule est notre modèle d'étude car son fonctionnement est altéré en cas de carence en ATRA, et il intègre de nombreuses problématiques (cellules souches ; identité, destin, prolifération et morphogenèse cellulaire ; divisions mitotique et méiotique, mort cellulaire).

La spermatogenèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires du testicule. Notre étude vise à comprendre les effets de l'ATRA dans un système physiologique. Seule une approche expérimentale avec des animaux permet de répondre à ces questions. Le remplacement par un système *in vitro* (1^{er} R de la règle des 3R) est impossible.

La souris est le modèle de choix car sa spermatogenèse dépend de l'ATRA, comme chez l'homme. Nous combinons des approches génétiques et pharmacologiques pour comprendre comment l'ATRA exerce ses effets. Nous créons des souris transgéniques ou des souris porteuses d'une ou plusieurs mutations. Les protocoles mis en œuvre permettent de synchroniser la spermatogenèse pour en faciliter la compréhension, et d'induire ou corriger la stérilité des mâles pour étudier le mécanisme moléculaire impliqué.

Le nombre d'animaux requis est de 8676 souris au maximum. Ces nombres sont calculés au plus juste pour satisfaire aux exigences en matière de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en assurant la qualité des résultats obtenus et la robustesse de leur validité statistique. La réduction du nombre d'animaux (2^e R de la règle des 3R) est donc appliquée dans notre projet.

Les animaux ne souffrent pas car le phénotype se limite à la stérilité des mâles. Nous tentons d'induire ou de corriger cette stérilité. Aucune des étapes expérimentales mises en œuvre n'engendre de la douleur aux animaux (autre que celle de l'injection des produits). Le bien-être est surveillé en permanence et toute altération du comportement des animaux (souffrance, angoisse) sera immédiatement discutée avec les responsables de la structure du bien-être animal (SBEA) pour prendre les mesures correctives nécessaires. Nous respectons ainsi le raffinement (3^e R de la règle des 3R) dans ce projet.

17314 Le cancer colorectal (CRC) est un cancer fréquent aussi bien chez l'homme que chez la femme, et il représente la deuxième cause de décès par cancer tous sexes confondus. Le CRC se développe à partir des cellules qui tapissent la paroi interne du côlon ou du rectum. Le plus souvent, ces tumeurs malignes proviennent d'une tumeur bénigne, appelée polype adénomateux, qui évolue lentement et finit par devenir cancéreuse.

Certains facteurs environnementaux, notamment présents dans l'alimentation, peuvent favoriser le développement du CRC.

Ce projet a pour objet de mettre en évidence le rôle de facteurs environnementaux dans la physiopathologie du CRC.

Dans ce but, un modèle de cancer colorectal sera induit chez la souris et l'impact de l'exposition aux facteurs environnementaux sera évalué sur le délai d'apparition et l'intensité du CRC.

Le modèle de CRC que nous emploierons est le plus connu par les scientifiques, appelé modèle AOM-DSS, appliqué à la souris. Il consiste à administrer à la souris un carcinogène puissant, l'asoxy méthane (AOM) et un toxique pour le côlon, le dextran sodium sulfate (DSS). Le CRC se développe très progressivement. L'évolution du CRC sera suivie par coloscopie. Au bout de 90 jours, des tumeurs de différentes tailles sont visibles dans le côlon distal.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir :

Remplacer : Les processus physiopathologiques complexes du cancer colorectal faisant intervenir la flore intestinale, le système immunitaire muqueux et systémique, ainsi que les contaminants alimentaires ne peuvent pas être modélisés *in vitro*

Réduire : La souris est l'espèce utilisée depuis de nombreuses années dans le modèle de cancer colorectal. Le modèle est largement décrit et sa bonne connaissance aujourd'hui permet d'éviter des étapes de mise au point et permet de minimiser les aléas expérimentaux, et donc au total le nombre d'animaux nécessaires.

Le nombre de souris a été réduit à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats. Les analyses statistiques seront effectuées via le test Mann Whitney permettant d'obtenir des données à partir d'un nombre d'échantillons faible.

Raffiner : Pour réduire l'angoisse, les procédures classiques seront appliquées : pas de bruit inutile et stressant, phase d'acclimatation pour tout changement d'environnement, enrichissement, application des procédures pour le nombre de souris par cage.

Les contaminants alimentaires sont administrés à des doses faibles et n'entraînent aucun phénotype délétère.

Les coloscopies sont réalisées sous anesthésie.

Pour la coloscopie et le cancer colorectal, des points limites ont été définis afin d'empêcher toute douleur ou souffrance.

Ce projet nécessitera pour 5 ans un nombre maximal estimé de 1200 souris et permettra de mieux comprendre et prévenir le cancer colorectal chez l'homme.

17315 La stéatose hépatique non alcoolique est une maladie du foie progressive complexe qui débute par l'accumulation de graisses dans le foie sans consommation excessive d'alcool. Elle est fortement associée au syndrome métabolique (obésité + résistance à l'insuline + dyslipidémie). En France, on estime à plus de 10 millions les personnes atteintes de stéatose, associée dans 90 % des cas à un syndrome métabolique, à l'obésité ou ses complications. Parmi elles, 80% des 6 à 7 millions d'obèses et 90% des 3 à 4 millions de diabétiques. Il n'existe actuellement aucun traitement médicamenteux approuvé montrant une efficacité pour la stéatose hépatique non-alcoolique. Seules les mesures hygiéno-diététiques constituent un traitement qui permet un ralentissement de la maladie pour qu'elle n'évolue pas en cirrhose.

Dans ce projet, nous chercherons à mettre en évidence l'effet d'ingrédients (de composition confidentielle) sur le développement de la stéatose hépatique dans le but de développer un complément alimentaire ralentissant le développement de la maladie.

Ce complément alimentaire pourra s'adresser à des patients chez qui une stéatose hépatique non alcoolique a été diagnostiquée en complément des mesures hygiéno-diététiques, aux personnes présentant une sensibilité génétique au développement d'une stéatose hépatique en dépit d'une bonne hygiène de vie, ainsi qu'aux patients obèses à titre préventif.

Nous étudierons l'effet biologique des compléments alimentaires en utilisant un modèle d'obésité induite par l'alimentation (régime apportant 60% de l'énergie sous forme de lipides supplémenté ou non par le complément à tester) chez des souris C57Bl6/J mâles. La durée du régime sera de 16 semaines. 60 animaux, soit 6 groupes de 10 animaux, seront nécessaires pour cette étude.

Le développement de l'obésité et ses conséquences métaboliques seront caractérisés par:

- pesée hebdomadaire et une mesure de la prise alimentaire à 1, 8 et 15 semaines
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique à 0, 8 et 16 semaines
- prélèvement de fèces à 1, 8 et 15 semaines pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications en fonction du régime.

La survenue de pathologies hépatiques sera observée à l'issue des 16 semaines de régime grâce à :

- pesée et histologie du foie
- dosage de marqueurs circulants de l'inflammation, du stress oxydatif
- quantification des activités enzymatiques hépatiques
- mesure de l'expression génique de marqueurs du métabolisme des acides gras
- prélèvement et analyse du contenu caecal

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* et *in silico* pour étudier l'impact de compléments alimentaires la prévention de l'obésité et l'apparition de la stéatose hépatique non-alcoolique. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'Homme.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives. Les animaux seront hébergés en cage de 3 à 4 individus, et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de matériel de nidification (bandelettes de papier kraft). Une crème anesthésique sera appliquée localement avant incision et prélèvement de sang à la queue ainsi que sur les oreilles lors du perçage pour identification. Les animaux seront manipulés régulièrement pour les habituer à notre contact et ainsi limiter leur stress. Les animaux seront pesés et observés quotidiennement par les expérimentateurs afin de contrôler leur bien-être.

17316 Les projets menés au sein de notre équipe visent à comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la chronicisation de la douleur. La douleur chronique touche 1/5ème de la population mondiale et son impact socio-économique est considérable. Elle demeure un enjeu majeur de santé publique car les traitements actuels sont très peu efficaces.

Au cours des six dernières années, nous avons identifié plusieurs gènes candidats pouvant jouer un rôle important dans la modulation de la douleur chronique. Notre but étant de comprendre la physiologie de la douleur, notre projet nécessite l'utilisation d'animaux et ne peut recourir à des stratégies de remplacement par des méthodes *in-vitro*. Notre étude nécessite donc l'utilisation de souris génétiquement modifiées (adultes) que nous analyserons par des tests comportementaux de sensibilité mécanique et thermique, en conditions normales et pathologiques (inflammatoire, neuropathique et post-opératoire). Les résultats de cette étude pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les objectifs proposés sont parfaitement réalisables sur 5 ans au vu des différentes ressources disponibles, financières (2 financements ANR et un financement équipe FRM) et humaines (5

chercheurs statutaires, 1 assistante-ingénieure, 1 chercheur post-doctoral, 3 étudiants en thèse et 1 étudiant en Master).

Les personnes affectées au projet sont formées et qualifiées à l'expérimentation animale : 5 personnes ont suivi la formation B, dont une a suivi la formation chirurgie, et tous les étudiants en thèse suivent la formation B. Par ailleurs nous utilisons du matériel de dernière génération et notre établissement possède un agrément propice à l'expérimentation animale.

Réduction : les procédures décrites sont appliquées depuis plusieurs années au sein de notre équipe et sont maîtrisées par les expérimentateurs. Nous avons donc l'expérience nécessaire concernant la réalisation des procédures et l'évaluation de l'impact sanitaire sur les animaux. La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique statistiquement valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet nécessitera au maximum 772 souris.

Raffinement : les souris utilisées dans ce projet seront élevées en groupes sociaux, dans un environnement enrichi, pour optimiser les conditions d'hébergement et favoriser un comportement normal de l'animal. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages. De ce fait, l'état sanitaire et environnemental des animaux sont contrôlés tous les jours.

Nous avons recours à l'anesthésie/analgésie lors du procédé chirurgical et des soins pré-, per- et post-opératoires adéquats sont administrés.

17317 L'athérosclérose se caractérise par le dépôt d'une plaque essentiellement composée de lipides riches en cholestérol qui déclenche un processus inflammatoire focal et disséminé de la paroi artérielle. Une microvasculature qui se développe silencieusement au cœur de la plaque sur plusieurs années est une caractéristique des plaques avancées vulnérables qui peuvent se rompre pour aboutir finalement à diverses manifestations cliniques telles que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ou l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Aujourd'hui, la formation des microvaisseaux sanguins dans la paroi des artères uniquement au niveau des plaques reçoit de l'attention en tant que cible d'imagerie afin de reconnaître les plaques vulnérables. Chez l'homme, ces microvaisseaux surexpriment de manière spécifique le récepteur de la FSH (FSHR), un récepteur membranaire qui dans des conditions physiologiques normales est localisé uniquement dans un sous-set des cellules au niveau des gonades (ovaires et testicules). Par conséquent, un anticorps FSHR lié à un produit visible au microscope peut être utilisé pour cibler les agents d'imagerie sur les lésions d'athérosclérose et ainsi déterminer leur localisation.

La présente demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques vise à obtenir, dans un modèle animal pour l'athérosclérose, la preuve de concept en étudiant la localisation du FSHR dans les lésions d'athérosclérose. Les animaux seront nourris pendant 5 mois avec une diète athérogène riche en cholestérol recommandée aux souris (Altromin, Allemagne). L'effet des inhibiteurs de l'hormone et du récepteur FSHR sur la localisation et stabilité des plaques d'athérosclérose sera également analysé. Au début du 5ème mois une seule dose d'inhibiteur FSH sera administrée par injection sous-cutanée) aux animaux du groupe B et groupe C. Pour le groupe C deux doses d'anticorps FSHR (10 mg/kg) seront administrées IP (le jour 1 - la première dose, et le jour 15 - la deuxième dose).

La présente demande d'autorisation de projet concerne un maximum de 18 souris. Les dommages attendus sont liés à l'apparition de plaques d'athérosclérose au niveau de l'aorte thoracique.

Ce projet sera mené conformément à la règle des 3R: injections d'un traceur visible au microscope électronique, qui ne suscitera pas de stress important à l'animal (raffiner). Le nombre d'animaux sera réduit au minimum avec 18 souris maximum qui seront répartis en trois groupes de 6 (réduire). Le développement de modèles animaux reste nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles représentatifs de la complexité d'un organisme entier dans un contexte athérosclérose (remplacer).

Les animaux seront suivis par observation individuelle chaque jour de la semaine, y compris durant le weekend, pour anticiper, le cas échéant, le développement de douleurs ou de souffrances. Les animaux seront également suivis individuellement par pesée 1 fois par semaine. Si une perte de poids est supérieure à 20% du poids initial, cela entraînera la mise à mort de l'animal. Par ailleurs, le changement

d'aspect de la peau (reflet de la qualité du toilettage de l'animal) et l'absence de toilettage seront évalués quotidiennement pour anticiper la souffrance des animaux.

17318 Avec une prévalence d'environ 5 à 8 cas pour 100 000 habitants et par an, les gliomes représentent les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Ils représentent 2000 à 3000 nouveaux cas par an en France et constituent donc une cause importante de souffrance et de mortalité. Souvent, ces tumeurs sont caractérisées par un développement rapide, une forte angiogenèse et une résistance aux thérapies classiques. Leur traitement repose, selon leur gravité, sur une exérèse chirurgicale, éventuellement associée à un traitement de chimiothérapie et/ou radiothérapie sur la base de données histologique et d'imagerie. Malgré cette prise en charge, le diagnostic est souvent sombre. Ceci peut s'expliquer par plusieurs raisons : un diagnostic trop tardif, des récurrences post-chirurgie apparaissent, une résistance à la chimiothérapie, une hétérogénéité tumorale ou encore une difficulté à distinguer la nécrose post chirurgicale de la progression de la maladie. L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et la SRM (Spectroscopie par Résonance Magnétique) sont particulièrement adaptées pour l'étude des tissus mous et donc du cerveau. L'utilisation d'agent de contraste injecté par voie intraveineuse permet d'améliorer la spécificité de la technique en améliorant le contraste sur les images et peut servir de « balises » pour une délivrance ciblée de médicaments. Son action sera d'autant plus efficace que la vascularisation de la tumeur sera importante et que la barrière hémato encéphalique (BHE) sera perméable à la molécule. L'IRM fournit des images dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'eau dans les tissus tandis que la SRM fournit des spectres dont les pics représentant les métabolites présents dans le cerveau (molécules permettant au cerveau de fonctionner).

Le but de ce projet est donc de caractériser par des acquisitions non invasives d'imagerie IRM et de spectroscopie SRM *in vivo* avec et sans agent de contraste au cours du développement (J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42) du gliome 5j 1) la vascularisation tumorale et la texture des différentes zones de la tumeur 2) le métabolisme tumoral et 3) la mise en place de la perméabilité de la BHE au cours du développement du gliome afin de pouvoir mettre en place une stratégie thérapeutique suffisamment tôt et lorsque la vascularisation est optimale pour la rendre la plus efficace possible.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste cependant le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant les glioblastomes. En particulier, l'existence de lignées de souris immunodéprimées (nude) qui autorisent la greffe de cellules tumorales humaines permet la mise en place de tests précliniques. Deux modèles de gliomes seront utilisés chez la souris soit par xénogreffes sous cutanées soit par injections intracrâniennes de cellules tumorales (U251MG et GL261).

Ce projet nécessitera 1196 souris 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 gliomes ne peut se faire que sur un organisme vivant entier.

Raffinement: ces modèles peuvent être associés à des effets néfastes importants: perte de poids sévère, symptômes neurologiques (mouvements anormaux...) ou une immobilité. Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale, et intègre des traitements analgésiques afin de prévenir ou de gérer l'apparition de douleurs. Les animaux sont d'ailleurs observés scrupuleusement tous les jours 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 et SRM qui sont deux techniques d'imagerie non invasives. De plus, des points limites prédictifs ont été mis en place.

Réduction: le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles. L'IRM pour le suivi des tumeurs ainsi que la SRM permettent aussi de réduire le nombre d'animaux puisque l'intérêt de ces techniques réside dans le fait qu'une même souris peut être observée plusieurs fois dans le temps.

17319 La télomérase est une protéine qui joue des rôles importants dans la régulation de la prolifération des cellules. En effet, la télomérase permet de conserver la longueur des chromosomes et ainsi de

contribuer à l'allongement de la vie des cellules. Ainsi, la télomérase est exprimée de façon anormale dans plus de 90% des cancers humains, toutes origines confondues. Outre la stabilisation des chromosomes, plusieurs études ont montré que la télomérase exerce d'autres fonctions, qualifiées de non-canoniques, qui favoriseraient la prolifération des cellules et qui renforceraient ainsi le développement de cancers. Cependant, les mécanismes ciblés par l'activité non-canonique de la télomérase et les mécanismes régulant cette activité restent méconnus. Comprendre ces mécanismes permettrait de développer des stratégies thérapeutiques innovantes visant à stopper la prolifération des cellules cancéreuses.

L'étude d'une lignée de souris génétiquement modifiées permettant d'augmenter l'expression de la télomérase chez la souris adulte a montré que le rein est un organe particulièrement sensible à l'activité non-canonique de la télomérase. En effet, l'augmentation du niveau d'expression de la télomérase perturbe fortement les cellules du rein qui sont responsables de la filtration du sang. La perturbation de ces cellules, caractérisée par l'activation de la prolifération, provoque un dysfonctionnement de la fonction de filtration rénale associé à une augmentation de la concentration en protéines dans les urines.

Des études précédentes ont permis d'identifier les molécules ciblées par la télomérase lors de la perturbation des cellules du rein chez des souris jeunes (3-6 mois). Aussi, il a été précédemment montré que le vieillissement interfère avec la capacité de la télomérase à perturber les cellules du rein et à activer leur prolifération. Dans ce projet, nous voulons identifier les cibles moléculaires de la télomérase dont l'activation est défectueuse chez les souris âgées. Pour ce faire, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées nous permettant d'augmenter le niveau d'expression de la télomérase chez des animaux âgés et nous allons identifier les molécules qui sont dérégulées dans les cellules du rein dans ce contexte. La comparaison ultérieure aux résultats obtenus chez des animaux jeunes, permettra d'identifier les cibles moléculaires de la télomérase qui montrent un défaut d'activation chez les animaux âgés comparé aux jeunes.

Deux caractéristiques physiologiques observables sont associées à l'augmentation de l'expression de la télomérase chez la souris adulte :

1-La pousse accélérée des poils, suivi par leur perte. Ce phénotype n'a aucun impact sur le bien-être des animaux, et l'hébergement des animaux en groupes de 4 favorise le maintien de la température corporelle des souris malgré la diminution de la densité des poils.

2-La perturbation des cellules du rein, associée à un dysfonctionnement de la filtration rénale.

3R:

1) Remplacement: Suite à ce projet, des analyses complémentaires seront mises en place sur des cellules en culture *in vitro* (Remplacement). Cependant, bien que les techniques de culture cellulaire aient fortement évoluées, les études *in vitro* ne permettent pas d'étudier des processus biologiques complexes tels que le vieillissement. Seuls les modèles animaux permettent d'aborder des questions relatives au fonctionnement d'un organe dans son ensemble. Le projet présenté ici a pour but de déterminer comment le vieillissement restreint les fonctions de la télomérase sur le rein adulte. Ainsi, par définition, cet objectif scientifique nécessite le recours à des animaux.

2) Réduction: Afin d'identifier les cibles moléculaires de la télomérase dont l'activation est défectueuse chez les souris âgées, nous allons exploiter les résultats déjà obtenus chez les animaux jeunes (3-6 mois) et utiliser 2 groupes d'animaux âgés : des animaux de 10 à 14 mois (âge moyen) et des animaux de 18 à 24 mois (âge avancé). Aussi, en tenant compte des exigences de réduction, également imposées 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. Ainsi, pour réaliser ce projet sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 80 animaux.

3) Raffinement : Les phénotypes mentionnés ci-dessus se développent lorsque l'augmentation d'expression de la télomérase est déclenchée chez l'animal adulte, et ils sont uniquement observés si l'expression forte de la télomérase est maintenue pendant plus de 3 semaines. Ainsi, afin de limiter l'impact de l'expression forte de la télomérase sur l'état général des animaux, nous réaliserons la collecte des cellules du rein à des stades très précoces d'augmentation d'expression de la télomérase, comme réalisé précédemment chez les animaux jeunes : après 5 jours et 10 jours de surexpression de

la télomérase (Raffinement). De plus, conformément à la réglementation éthique en vigueur qui impose de mettre en place les mesures permettant d'augmenter autant que possible le bien-être des animaux de laboratoire, nous avons mis en place un suivi strict et régulier de la douleur et du stress potentiellement engendrés par la procédure expérimentale décrite dans ce projet grâce à l'utilisation d'une grille de score (annexe 1) (Raffinement).

17320 La voie PIWI/piRNA dans l'auto-renouvellement et le vieillissement des macrophages RNT

Les macrophages sont des composants cellulaires du système immunitaire inné. Ils résident dans tous les tissus des vertébrés y compris ceux de l'Homme où ils contribuent à l'immunité, la réparation et l'homéostasie tissulaire. Historiquement, les macrophages sont considérés comme des cellules à durée de vie courte qui sont continuellement remplacés par de nouvelles cellules produites par les cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes dans la moelle osseuse. Des données récentes de la littérature démontrent que les macrophages tissulaires proviennent en fait de progéniteurs embryonnaires, qu'ils se développent dans les tissus de résidence et y persistent à l'âge adulte en proliférant localement. En fonction des tissus, cette prolifération locale peut se maintenir plus ou moins longtemps : certains tissus comme le foie, présentent un remplacement rapide après la naissance des macrophages d'origine embryonnaire par d'autres venant de la CSH ; d'autres tissus maintiennent, tout au long de l'individu, des macrophages d'origine embryonnaire. Leur durée de vie longue, conduit les macrophages d'origine embryonnaire à être eux aussi soumis au vieillissement. Les changements fonctionnels liés au vieillissement des macrophages eux-mêmes et leurs conséquences sur le fonctionnement des organes qui les hébergent commencent seulement à être étudiés.

Ainsi, on sait maintenant que les changements liés au vieillissement des macrophages sont susceptibles d'avoir des conséquences importantes pour la santé des sujets âgés. Il devient donc central de comprendre si et comment le vieillissement, ou ses conséquences moléculaires, peuvent être inversés afin de restaurer, chez les sujets âgés, de meilleures fonctions immunitaires et régénératives pour les macrophages.

On sait maintenant qu'en vieillissant les macrophages tissulaires d'origine embryonnaire perdent leur capacité d'auto-renouvellement et ceci semble avoir des conséquences fonctionnelles importantes aussi bien au niveau de l'immunité, de la réparation et de l'homéostasie tissulaire. L'objectif de ce projet est de mieux comprendre l'auto-renouvellement des macrophages pendant le vieillissement, afin à terme d'être éventuellement capable de « relancer » la prolifération locale des macrophages et ainsi de restaurer les fonctions immunitaires et régénératives optimales des macrophages chez les sujets âgés.

Puisque l'auto-renouvellement est une caractéristique intrinsèque des cellules souches, nous voulons d'étudier si les mêmes mécanismes qui contrôlent l'auto-renouvellement des cellules souches contrôlent aussi celui des macrophages tissulaires.

Un des mécanismes bien connu dans les cellules souches pour permettre un auto-renouvellement de qualité est la voie PIWI/piRNA. Cette voie contribue à la longévité et à l'auto-renouvellement des cellules souches en maintenant sous contrôle les "éléments transposables" du génome. Les éléments transposables sont des régions génomiques, héritées d'infection virales ancestrales, capables de se déplacer d'un endroit du génome à un autre. Ces déplacements se produisent de manière incontrôlée et s'ils ont lieu dans des régions fonctionnellement actives du génome, comme des gènes ou des séquences régulatrices, ils peuvent provoquer des changements indésirables dans la fonction cellulaire. L'instabilité génomique induite par de tels "éléments transposables" est préjudiciable pour les cellules et conduit normalement à un arrêt de la prolifération et à une durée de vie plus courte pour les cellules affectées.

L'activation de la voie PIWI/piRNA permet de contrôler ces "éléments transposables" et empêche leur déplacement. Une bonne activité de cette voie est nécessaire dans les cellules à durée de vie longue et à fort potentiel d'auto-renouvellement comme les cellules souches et potentiellement des macrophages tissulaires. Nous avons donc décidé de vérifier si cette voie est aussi importante pour l'auto-renouvellement et la longévité des macrophages tissulaires.

La règle des 3R sera respectée dans ce projet :

Remplacement: Dans l'impossibilité d'obtenir des échantillons de macrophages de différents tissus humains (nécessitant des prélèvements invasifs), l'utilisation de modèles animaux est indispensable. De plus, la seule manière d'aborder de manière efficace et pertinente la question que nous posons est d'utiliser des modèles de souris génétiquement modifiées qui n'ont pas de voie PIWI/piRNA fonctionnelle. Ne pouvant donc pas remplacer le modèle murin, nous réduisons autant que possible leur utilisation.

Réduction : Sur la base de nos données préliminaires et grâce à l'utilisation de tests statistiques adaptés, nous déterminerons le nombre minimum de souris nécessaire pour chaque expérimentation permettant d'obtenir un résultat statistiquement significatif. Nous incluons dans nos groupes expérimentaux aussi bien les mâles que les femelles afin de limiter au strict minimum le nombre d'animaux produits pour l'expérimentation. Un total de 2337 individus sera utilisé pour ce projet.

Raffinement: Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les souris afin d'obtenir des données qui soient le moins biaisées possible par le "mal être" de l'animal. Une anesthésie générale sera utilisée durant les procédures expérimentales. Nous vérifierons l'état de santé des souris quotidiennement: tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation) sera relevé et évalué grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Si les souris présentent une perte de poids supérieure ou égale à 20% de leur poids maximum ou si des signes de souffrances apparaissent, les animaux seront mis à mort. Durant l'ensemble de l'étude, les souris seront hébergées dans des conditions conformes à la réglementation européenne en vigueur (environnement contrôlé: température et ventilation régulées, lumière avec un cycle de 12h, hygrométrie), avec un accès continu à la nourriture et à l'eau. Les souris seront maintenues en groupes de 3 à 5 animaux par cage. L'environnement sera enrichi par des dômes en carton ou du coton.

17321 Développement de l'Imagerie Spectrale X pour l'investigation de l'athérosclérose chez le lapin
Mots clés : athérosclérose, modèle animal, tomодensitométrie spectrale, produit de contraste
Ce projet de recherche fondamentale et appliquée, d'une durée de 4 ans, utilisera une espèce animale : 45 lapins répartis dans une procédure sévère.

Les pathologies vasculaires représentent un enjeu majeur de santé publique par le grand nombre de décès, suite à des accidents vasculaires aigus résultants entre autre de la rupture d'une plaque d'athérosclérose.

La tomодensitométrie (TDM) par rayons X est une technique d'imagerie médicale en coupe, qui permet d'explorer de façon non-invasive les modifications morphologiques et physiologiques liées à la présence de différentes pathologies. Une méthode complémentaire, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), à la différence de l'imagerie X, offre un très bon contraste des tissus mous. Cependant la résolution spatiale est plus faible.

Une innovation technologique très récente au niveau des détecteurs de rayons X permet potentiellement de s'affranchir d'un certain nombre de limites de la technique TDM standard. Elle permet d'obtenir une information très spécifique sur la présence des différents éléments chimiques dans l'échantillon traversé par les rayons X et d'en obtenir une cartographie de leur distribution, ainsi qu'une quantification.

Dans le contexte de cette technologie nouvelle et innovante, il est crucial de développer des nouvelles stratégies d'acquisition d'images dédiées au diagnostic de l'athérosclérose qui permettent d'exploiter pleinement les avantages préconisés par cette technologie. Ainsi, notre projet vise à développer des stratégies d'acquisition d'images vasculaires sur un nouveau prototype de TDM, un système d'imagerie spectrale X (Scanner spectral) qui seront ensuite comparées avec des acquisitions utilisant d'autres méthodes d'imagerie, et validées par des analyses histologiques. Compte tenu du fait que les difficultés de l'imagerie vasculaire *in vivo* sont l'écoulement sanguin et les faibles doses de produit de contraste accumulées au niveau tissulaire, le développement et l'optimisation doit impérativement se faire chez l'animal et la règle de remplacement ne peut pas s'appliquer.

Nuisances et effets néfastes prévus :

45 lapins seront utilisés dans une procédure d'angioplastie, classée sévère, combinée avec un régime gras pour le développement de plaques d'athérosclérose. La sévérité de cette procédure nécessite une prise en charge adaptée avec opération des animaux en condition stérile, analgésie pré et post opératoire et traitement anti-inflammatoire afin de garantir le succès du modèle.

Ce modèle animal d'athérosclérose sera utilisé afin d'investiguer trois types d'agents de contraste. La règle de réduction s'applique pleinement, en effet, notre connaissance du modèle de lapin pour l'avoir déjà utilisé dans d'autres projets nous permettra d'utiliser un nombre réduit d'animaux, de plus, l'imagerie permet un suivi dans le temps du même animal. L'avantage du modèle de lapin est la taille de l'aorte abdominale très proche de la taille des artères coronaires humaines, ils seront utilisés pour nous permettre de valider la prise de contraste intra-pariétale.

La règle de raffinement est aussi appliquée, pour les lapins, par l'utilisation de cages enrichies : bâton et bloc de cellulose à ronger, foin, paroi de cages transparentes permettant aux animaux de se voir ; le raffinement est aussi mis en place au cours de la procédure via des traitements analgésiques, anti-inflammatoires et une grille de suivi adaptés.

17322 La consommation excessive d'alcool est la première cause de cirrhose en France. L'atteinte du foie (atteinte hépatique) débute par une accumulation de gouttelettes lipidiques (triglycérides) dans les cellules du foie appelée stéatose. Durant l'abus d'alcool, cette stéatose peut évoluer vers une inflammation du foie appelée hépatite alcoolique. La maladie peut ensuite évoluer vers la fibrose (stade auquel les cellules du foie ne se régénèrent plus et où un tissu cicatriciel apparaît) puis la cirrhose et jusqu'au cancer du foie. La mortalité des formes sévères de l'hépatite alcoolique est comprise entre 50 et 75%. La corticothérapie est le seul traitement qui peut améliorer le pronostic à court terme. Ainsi, parmi les sujets ayant une forte consommation d'alcool à long terme, la majorité des patients développent une stéatose, mais seulement 10 à 35% développeront une hépatite alcoolique et 8 à 20% évolueront vers la cirrhose. D'autres facteurs que la seule consommation excessive d'alcool interviennent dans la genèse des lésions hépatiques. La recherche de facteurs qui relient consommation d'alcool, nature et progression des lésions hépatiques est donc essentielle pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques améliorant la prise en charge de ces formes graves.

L'autophagie est un mécanisme physiologique de protection et de recyclage cellulaire mis en place par la cellule. Lors de ce processus, les macromolécules et les organites altérés sont dégradés par les lysosomes. Il a été démontré que l'autophagie joue un rôle important dans la maladie alcoolique du foie. Dans les modèles d'alcoolisation chronique, il existe une inhibition de l'autophagie avec une accumulation intrahépatocytaire des protéines et une perturbation des fonctions des lysosomes.

Parmi les molécules qui module l'autophagie, l'« Acyl-CoA-Binding Protein » (ACBP) est capable d'inactiver l'autophagie. L'ACBP est augmentée chez les patients et les souris obèses, chez qui on observe une inhibition de l'autophagie et des lésions hépatiques similaires à celles observées lors de la consommation chronique d'alcool. L'utilisation d'un anticorps contre l'ACBP a montré une amélioration des lésions hépatiques chez ces individus. L'hypothèse de notre étude est que l'inactivation de l'ACBP dans la MAF pourrait également améliorer les lésions hépatiques.

L'objectif de ce projet est de montrer le rôle de l'ACBP dans la maladie alcoolique du foie. Dans un premier temps, le traitement anti ACBP sera donné en préventif, c'est à dire avant de commencer l'alcoolisation chronique pour prouver que stimuler l'autophagie a un rôle protecteur. Si ce résultat est confirmé, nous traiterons les souris de manière curative en donnant l'anti ACBP après le début de l'alcoolisation et à un moment où les lésions hépatiques ont déjà commencé pour prouver le rôle thérapeutique de la stimulation autophagique.

Les complications hépatiques observées au cours de la maladie alcoolique du foie mettent en jeu des interactions entre les différents organes qu'il est actuellement impossible de reproduire *in vitro*. Il nous faut étudier l'effet de l'alcool ingéré sur les processus physiologiques tels que l'autophagie et l'impact de cette voie sur le développement des lésions du foie. Le seul modèle auquel nous pouvons avoir recours est l'animal (Remplacement). Le rongeur, ici la souris, partage bon nombre de processus cellulaires

avec l'Homme et un modèle d'alcoolisation 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, qui pourrait modifier la réponse à l'alcool, 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 80 souris, nombre d'animaux qui est réduit au minimum, mais suffisant pour pouvoir faire des comparaisons et des statistiques exploitables (« Réduction »).

17323 Notre projet a pour but d'étudier le rôle du transporteur de phosphate PIT1 dans les adipocytes au cours du diabète de type 2 et de l'Obésité. Pour cela, nous évaluerons l'homéostasie glucidique de souris transgéniques soumises à un régime obésogène et à un régime normal.

L'obésité est actuellement décrite comme l'épidémie mondiale du 21ème siècle et représente un problème majeur de santé publique. De nombreuses études démontrent que le phénotype du tissu adipeux est un des processus biologiques majoritairement perturbé; ce phénomène contribue à la progression de l'obésité et à ses complications métaboliques et cardiovasculaires. Le tissu adipeux apparait comme l'organe majeur responsable du développement de l'obésité et des complications. Il existe un besoin urgent de comprendre les mécanismes moléculaires dérégulés chez l'obèse et de les contrôler. Des études récentes démontrent que le transporteur membranaire PIT1 (Phosphate Inorganic Transporter 1) est impliqué dans la régulation de l'homéostasie glucidique. En effet, des souris invalidées spécifiquement pour Pit1 dans les hépatocytes améliorent la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. Etant donné que le tissu adipeux et plus particulièrement les adipocytes, participe au contrôle de l'homéostasie glucidique, nous émettons l'hypothèse que les souris PIT-1 KO dans les adipocytes vont présenter une sensibilité accrue à l'insuline.

Pour valider notre hypothèse, nous utiliserons des souris transgéniques : invalidation du transporteur PIT1 dans les adipocytes. Ces souris seront soumises :

- soit à un régime normal (contrôle) ou un régime gras pendant 4, 8 et 12 semaines. Durant ce traitement obésogène ou non, l'homéostasie glucidique sera quantifié grâce à des tests métaboliques (test de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline).
- soit à un traitement par un agoniste des récepteurs beta3-adrénergiques pendant 5 jours qui va permettre l'activation du métabolisme énergétique du tissu adipeux.

Afin d'avoir une caractérisation complète et statistiquement robuste, nous allons utiliser 20 souris par groupe soit 320 souris au total.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées sera réduit au minimum : analyses de paramètres multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés. Pour s'assurer du « 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 par le personnel de l'animalerie et 2 à 3 fois par semaine par les responsables du projet avec une évaluation de l'état général de l'animal, de la perte de poids, de l'apparence et du comportement de l'animal. 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 d'identifier des mécanismes moléculaires impliqués dans le diabète de type 2 et l'obésité et plus particulièrement le rôle du transporteur PIT1.

AMENDEMENT

La demande d'amendement de ce projet concerne la modification de la durée du régime gras avec suppression du temps d'une semaine et l'ajout d'un traitement par un agoniste des récepteurs beta3-adrénergiques pendant 5 jours pour un groupe de souris, ce qui va permettre l'activation du métabolisme énergétique du tissu adipeux.

Afin d'avoir une caractérisation complète et statistiquement robuste, nous allons utiliser 20 souris par groupe soit 320 souris. Le nombre total d'animaux est inchangé.

17324 L'acide rétinoïque (ATRA) est essentiel car c'est une vitamine. Notre recherche consiste à comprendre les mécanismes que l'ATRA contrôle pour exercer ses effets. Le testicule, siège de la spermatogenèse, est notre modèle d'étude car son fonctionnement est altéré en cas de carence en ATRA, et il intègre de nombreuses problématiques (cellules souches ; identité, destin, prolifération et morphogenèse cellulaire ; divisions mitotique et méiotique, mort cellulaire).

La spermatogenèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires du testicule. Notre étude vise à comprendre les effets de l'ATRA dans un système physiologique. Seule une approche expérimentale avec des animaux permet de répondre à ces questions. Le remplacement par un système *in vitro* (1er R de la règle des 3R) est impossible.

La souris est le modèle de choix car sa spermatogenèse dépend de l'ATRA, comme chez l'homme. Nous combinons des approches génétiques et pharmacologiques pour comprendre comment l'ATRA exerce ses effets. Les protocoles mis en œuvre permettent d'induire une ou plusieurs mutations chez la souris, uniquement dans un type cellulaire choisi.

Le nombre d'animaux requis est de 60 souris au maximum. Ce nombre est calculé au plus juste pour satisfaire aux exigences en matière de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en assurant la qualité des résultats obtenus et la robustesse de leur validité statistique. La réduction du nombre d'animaux (2e R de la règle des 3R) est donc appliquée dans notre projet.

Le phénotype se limitant à la stérilité des mâles, les animaux ne souffrent pas des mutations génétiques générées. Comme l'exige l'éthique, dans tous les cas, des protocoles d'anesthésie et d'analgésie appropriés seront appliqués. Le bien-être est surveillé en permanence et toute altération du comportement des animaux (souffrance, angoisse) sera immédiatement discutée avec les responsables de la structure du bien-être animal (SBEA) pour prendre les mesures correctives nécessaires. Nous respectons ainsi le raffinement (3e R de la règle des 3R) dans ce projet.

17325 L'acide rétinoïque (ATRA) est essentiel car c'est une vitamine. Notre recherche consiste à comprendre les mécanismes que l'ATRA contrôle pour exercer ses effets. Le testicule est notre modèle d'étude car son fonctionnement est altéré en cas de carence en ATRA, et il intègre de nombreuses problématiques (cellules souches ; identité, destin, prolifération et morphogenèse cellulaire ; divisions mitotique et méiotique, mort cellulaire).

La spermatogenèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires du testicule. Notre étude vise à comprendre les effets de l'ATRA dans un système physiologique. Seule une approche expérimentale avec des animaux permet de répondre à ces questions. Le remplacement par un système *in vitro* (1er R de la règle des 3R) est impossible.

La souris est le modèle de choix car sa spermatogenèse dépend de l'ATRA, comme chez l'homme. Nous combinons des approches génétiques et pharmacologiques pour comprendre comment l'ATRA exerce ses effets. Les protocoles mis en œuvre permettent d'induire une ou plusieurs mutations chez la souris, uniquement dans un type cellulaire choisi.

Le nombre d'animaux requis est de 3900 souris au maximum. Ces nombres sont calculés au plus juste pour satisfaire aux exigences en matière de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en assurant la qualité des résultats obtenus et la robustesse de leur validité statistique. La réduction du nombre d'animaux (2e R de la règle des 3R) est donc appliquée dans notre projet.

Les animaux ne souffrent pas car le phénotype se limite à la stérilité des mâles. Nous tentons d'induire ou de corriger cette stérilité. Aucune des étapes expérimentales mises en œuvre n'engendre de la douleur aux animaux (autre que celle de l'injection des produits). Le bien-être est surveillé en permanence et toute altération du comportement des animaux (souffrance, angoisse) sera immédiatement discutée avec les responsables de la structure du bien-être animal (SBEA) pour prendre les mesures correctives nécessaires. Nous respectons ainsi le raffinement (3e R de la règle des 3R) dans ce projet.

17326 La glomérulonéphrite extramembraneuse (GEM) est une maladie autoimmune rénale rare mais grave avec une incidence d'environ 1,3 cas/100 000 habitants par an en France et en Europe. Il s'agit cependant d'une cause majeure de syndrome néphrotique, conduisant à la perte du rein pour environ 40% des patients. Le diagnostic et la prise en charge de la GEM sont complexes, et les thérapies actuelles sont basées sur l'utilisation d'immunosuppresseurs non spécifiques induisant des effets secondaires graves.

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la maladie (réaction autoimmune et production des anticorps) et de la perte du rein (action directe des anticorps circulants sur les podocytes du rein) commencent à être compris depuis moins de 10 ans. En 2009, le principal élément du rein contre lequel le système immunitaire se retourne (c'est-à-dire le principal autoantigène) impliqué dans la GEM adulte a été identifié: il s'agit de PLA2R1, un récepteur présent dans les podocytes du rein, des cellules d'une importance cruciale pour la fonction de filtration rénale. Environ 70% des patients ont des anticorps circulants dirigés contre PLA2R1. Ces anticorps permettent un meilleur diagnostic des formes de GEM liées à PLA2R1 et une meilleure prise en charge des patients, puisque le dosage des anticorps (il existe déjà des tests commerciaux) permet d'affiner le diagnostic et le pronostic des malades et d'orienter le choix d'une thérapie parmi les différentes options disponibles. Un deuxième autoantigène, THSD7A, a été identifié en 2014 pour un autre groupe de patients d'environ 2%. Il reste donc à découvrir les autres autoantigènes pour les patients qui ne présentent d'anticorps ni pour PLA2R1 ni pour THSD7A (soit environ 28% des patients). Enfin, les patients atteints de GEM liée à PLA2R1 présentent plusieurs types d'anticorps anti-PLA2R1 dans le sang, dont la nature et la quantité sont associées à la sévérité de la maladie. Les fonctions normales de PLA2R1 et THSD7A dans le rein sont encore inconnues.

La formation de complexes immuns constitués par les autoanticorps et leurs autoantigènes au niveau de la membrane basale glomérulaire, proche de la surface des podocytes, est une caractéristique fondamentale de la maladie. Cependant, le rôle pathogénique des anticorps anti-PLA2R1 dans le développement de la GEM n'est pas formellement démontré. C'est ce que nous proposons de faire dans ce projet.

Il n'existe à ce jour aucun modèle animal permettant de récapituler la physiopathologie de la GEM due à PLA2R1 et de montrer la pathogénicité des autoanticorps. La raison principale est l'absence d'expression naturelle de PLA2R1 dans les podocytes chez la souris, le rat ou le lapin, les espèces les plus utilisées dans la recherche préclinique biomédicale. Plusieurs laboratoires ont essayé de surexprimer PLA2R1 dans les podocytes de souris, mais à ce jour sans succès. L'utilisation d'un primate non-humain dans le cadre de ce projet est donc justifiée par l'impossibilité d'établir un modèle de la maladie chez le rongeur.

Ce projet vise à établir le premier modèle de GEM liée à PLA2R1 chez un primate non humain, le singe écureuil (*Saimiri sciureus*). L'expression de PLA2R1 a été validée dans les podocytes de ce primate, à des niveaux comparables à ceux mesurés chez l'homme.

Le projet a deux objectifs principaux indépendants:

1. Induire la maladie rénale en injectant chez l'animal des anticorps anti-PLA2R1 purifiés à partir de sérum de patients atteints de GEM. Ce modèle d'immunisation « passive » de la GEM est relativement simple car il ne dépend pas de la mise en place d'une réponse autoimmune chez l'animal mais seulement de la capacité des anticorps de patients à se lier sur PLA2R1 dans le rein et former des complexes immuns, ce que l'on attend puisque PLA2R1 est présent dans les podocytes de l'animal et reconnu par les anticorps de patients.

2. Induire la maladie rénale en injectant cette fois l'antigène PLA2R1 sous différentes formes pour reproduire chez l'animal une réaction autoimmune conduisant à la production d'autoanticorps anti-PLA2R1 et à leur toxicité sur le rein. Ce modèle d'immunisation active de la GEM est plus proche de ce qui se passe chez les patients, depuis la mise en place de la réaction autoimmune à l'action des anticorps au niveau du rein.

Ce projet utilisera un total de 12 primates mâles adultes. Objectif 1: 4 individus, chacun injecté avec des anticorps différents provenant de 3 patients et d'un donneur sain. Objectif 2: 8 individus répartis en 4 groupes de 2. Chaque groupe sera injecté avec des antigènes PLA2R1 différents pour tenter d'induire une réponse autoimmune. Tous les primates seront hébergés au sein d'une plateforme de primatologie,

permettant de garantir des procédures expérimentales et un protocole de soins optimal si la maladie est induite par l'un des protocoles ci-dessus (analgésie, antalgie, thérapie, bien-être animal, etc).

S'il aboutit, ce projet permettra de montrer pour la première fois la pathogénicité des anticorps anti-PLA2R1 dans un modèle animal très proche de la pathologie humaine, ce qui permettra de 1) mieux comprendre les mécanismes de la maladie et 2) ouvrir la voie à une thérapie spécifique.

17327 Dans le cadre du programme de restauration du saumon atlantique, des repeuplements en juvénile sont effectués chaque année sur les cours d'eau du haut bassin de la rivière X au stade alevin (saumon de 1 à 3 mois) et de la rivière Y au stade smolt (saumon de 1 an prêt à migrer vers l'océan).

L'objectif du projet est de compléter les suivis effectués au niveau des stations de contrôle par vidéo comptage des adultes remontant la rivière X et la rivière Y. Il s'agit notamment d'évaluer le taux de retour entre les stades smolt et adulte des saumons issus du repeuplement, mesurer le taux d'égaré des individus entre les deux sous bassins (individus repeuplés sur un sous bassin et remontant sur l'autre sous bassin) et de vérifier l'efficacité des deux stratégies de repeuplement utilisées.

L'opération consiste à permettre, grâce à l'utilisation d'un procédé de marquage non invasif et visible lors des contrôles vidéo, de déterminer l'origine des saumons adultes de retour issus du repeuplement au stade alevin sur la rivière X et ceux repeuplés directement au stade smolt sur la rivière Y.

Remplacement : Cette évaluation du repeuplement, qui prend en compte une grande partie du cycle biologique du saumon atlantique, notamment le passage en mer ne peut être réalisée qu'avec des saumons atlantiques issus du bassin et introduits dans le milieu naturel. L'utilisation d'autres modèles n'est ici pas envisageable, l'espèce ne peut être remplacé par une autre espèces.

Raffinement : le type de marquage choisi est l'ablation de la nageoire adipeuse sous anesthésie générale du poisson. Comparé à d'autre type de marquage, il évite l'intrusion de corps étrangers dans le poisson. Cette ablation est aisée et rapide. Cette nageoire caractéristique des salmonidés ne repousse pas. Sa présence ou son absence est décelable sur les images vidéo des stations de contrôle. Les animaux utilisés une fois marqué sont relâchés dans leur environnement et ne seront pas recaptures, ni manipulés une deuxième fois. Ils pourront poursuivre intégralement leur cycle biologique en milieu naturel.

Toutes les manipulations seront mises en place afin de réduire au maximum le stress des poissons : tenu le moins possible hors de l'eau, sédaté lors de la manipulation pour limiter la douleur.

Pendant la phase de réveil qui s'effectue dans un bassin alimenté en permanence par l'eau du fleuve les poissons seront surveillés, en vérifiant notamment la ventilation et le retour rapide à un comportement normal.

Réduction : le protocole sera réalisé sur 5 ans :

-Première année marquage au printemps des smolts issus du repeuplement au stade alevin et capturés lors de la migration vers l'océan sur la rivière X,

-Deuxième année début du contrôle des adultes d'un hiver de mer en remontée sur les deux axes et marquage des smolts libérés sur la rivière Y.

-Troisième à cinquième années : contrôle des adultes ayant passé de 1 à 3 hivers en mer. La distinction des âges de mer est faite par la taille sur les images vidéo.

Les taux de retour observés dans les suivis et les estimations faites ces dernières années, (smolts / adultes) sont généralement très faibles (de 0,25 à 1%). Cette opération nécessite d'avoir un échantillon minimum d'individus marqués au stade smolt (16 000 individus) afin de permettre à minima le contrôle de quelques dizaines d'adultes de retour.

Le protocole permet ainsi de limiter l'effectif du nombre d'individus utilisés sur 5 ans et évite de marquer l'ensemble des saumons repeuplés chaque année sur les deux bassins (1,2 millions d'individus).

17328 Exploration fonctionnelle du système visuel par Imagerie photonique et électrophysiologie chez le rongeur

- Contexte scientifique - La vision est une entrée sensorielle majeure pour nos actions, la perception et la réalisation de diverses tâches cognitives. Cependant, le traitement de l'information visuelle est un réel défi car ce qui atteint le cerveau est souvent incomplet et ambigu. En plus, souvent la scène visuelle évolue en fonction du temps. Imaginons, par exemple, de devoir suivre du regard le vol d'une mouche pendant qu'il pleut. Une telle tâche, apparemment réalisée sans difficulté, nécessite une ségrégation entre le mouvement de l'animal et celle des gouttes d'eau, qui non seulement ressemblent à la cible mais aussi souvent la cachent à la vue. Pour résoudre ce problème, notre système visuel doit combiner les signaux sensoriels avec des connaissances préexistantes (innées ou accumulées avec l'expérience), par exemple, dans le cas mentionné, sur des caractéristiques plus ou moins probables du vol de mouche (vitesse, forme géométrique...). Depuis 50 ans, les neurosciences visuelles ont accumulé beaucoup de connaissances sur ces sujets, mais principalement sur la base d'étude de neurones individuels. Or il apparaît clair que les traitements opérés par le système visuel sont distribués parmi des grandes populations de neurones en interaction dynamique. Pour comprendre ces traitements, il est donc nécessaire d'enregistrer d'un grand nombre de neurones.

- Objectifs - Notre objectif est de mieux comprendre les opérations neuronales qui relèvent ces défis à l'échelle du neurone individuel, en passant par des petits groupes de cellules, jusqu'à une partie substantielle d'une ou de plusieurs aires corticales. Ceci nous permettra d'explorer les calculs dynamiques qui se déroulent au sein de différentes aires corticales visuelles et à différents niveaux (de l'activité neuronale au comportement). Pour ce faire, nous utiliserons le modèle rongeur (rat mais surtout souris) anesthésié ou éveillé, chez lequel nous enregistrons l'activité neuronale à l'aide des dernières techniques disponibles. Celles-ci permettent de mesurer avec grande précision l'activité de grandes populations neuronales. Ces techniques sont l'imagerie optique à champ large et la microscopie multi-photonique, où l'activité neuronale est transformée en signaux lumineux avant de les enregistrer par voie optique. Pour enregistrer directement l'activité électrique des neurones, nous utiliserons aussi des microélectrodes, en privilégiant aux modèles rigides (en verre, métal...) les modèles organiques car elles sont transparentes et, étant extrêmement flexibles, elles sont mieux tolérées par les tissus. Les enregistrements seront effectués dans le cortex visuel primaire et dans d'autres aires clés du cortex visuel.

- Règle des 3R -

REPLACER : Ce projet vise à mieux comprendre comment l'information visuelle est interprétée pour guider l'exploration visuelle et la construction des perceptions. Cela nécessite d'avoir accès à l'activité des "vrais" réseaux neuronaux (c'est à dire, chez des organismes vivants) avec une grande résolution spatio-temporelle. Pour l'instant, cela est impossible in-silico, in-vitro, et même in-vivo avec des méthodes entièrement non-invasives. Nous utiliserons donc, in-vivo, une panoplie d'outils d'enregistrement nous permettant d'avoir accès à l'activité de population à l'échelle micro- et mésoscopique: la microscopie multi-photons, l'imagerie optique à champ large et des électrodes.

Nous nécessitons d'un modèle animal ayant un système visuel comparable à l'humain, sans avoir besoin d'un niveau de similitude typique du primate non humain, la présence d'un cortex visuel primaire (entré thalamique massive) étant suffisant. Cela permet de remplacer les primates par la souris et, quand une meilleure acuité visuelle est nécessaire, le rat. Certaines particularités de l'organisation fonctionnelle du cortex de ces animaux (p. ex. la sélectivité "sel-et-poivre" par rapport à l'orientation), sont d'ailleurs préférables pour certains aspects de notre projet. Nous travaillerons pendant 5 ans sur le rongeur : principalement la souris et, dans le cas qu'une meilleure acuité visuelle soit nécessaire, sur le rat.

REDUIRE : Quand ce sera possible, nous utiliserons des approches chroniques pour minimiser le nombre d'animaux :

- 1) Animal éveillée. Sur ces animaux nous enregistrons l'activité cérébrale par (i) imagerie optique, (ii) électrodes (en majorité chroniquement implantées) et/ou (iii) microscopie multi-photons.
- 2) Dans le cas d'explorations fonctionnelles nécessitant un niveau réduit de bruit, nous utiliserons une préparation anesthésiée, en majorité chronique. Dans ce cas, afin de minimiser la probabilité de traumatismes physiques au cortex, les électrodes seront en place uniquement pendant l'enregistrement, qui sera effectué sous anesthésie, puis retirées.

Nos questions scientifiques portant sur des sujets encore largement inexplorés, l'amplitude et surtout la variabilité des effets recherchés ne sont connus que partiellement ou pas de tout, ce qui rend difficile d'évaluer précisément le nombre d'animaux nécessaires pour assurer la fiabilité statistique de notre étude. Nous avons donc estimé ce nombre en utilisant un algorithme d'estimation générale (« resource equation method ») qui nous a amené à des nombres typiques dans la littérature (chaque résultat est à reproduire, de façon incontestable, sur au moins une dizaine d'individus) : 1142 souris et 46 rats. Ces nombres seront affinés après la première année et communiqués au comité éthique en fonction des nouvelles informations acquises pendant le déroulement du projet. Notamment, ces nombres seront réduits dans le cas de résultats extrêmement probants ou au contraire disqualifiants, obtenus en cours du protocole expérimental.

RAFFINER : Les animaux seront hébergés dans cages enrichies (coton, rouleaux de carton), avec accès illimité à la nourriture et à l'eau. Ils seront vérifiés quotidiennement par des personnes compétentes, en utilisant les critères et notations d'une échelle standardisée d'interprétation des expressions faciales de l'animal, la « mouse (rat) grimace scale », intégrés avec des critères comportementaux standard, pour la détection de souffrance et sa comparaison avec les points limites. Protocoles, prémédication, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires périodiquement discutés avec un vétérinaire ou un ingénieur d'étude en expérimentation animale, afin de les améliorer et les mettre à jour.

17329 Les maladies douloureuses chroniques touchent près de 30% de la population. Elles sont dues à une inflammation périphérique (douleur inflammatoire) ou à une lésion nerveuse (douleur neuropathique). A l'inverse de la douleur aiguë qui a un rôle protecteur pour l'individu, puisqu'elle l'alarme de l'application de stimuli nocifs, la douleur chronique est délétère pour l'individu car elle affecte négativement la qualité de vie des patients et leur vie sociale, d'autant qu'elle s'accompagne, avec le temps, de comportements anxio-dépressifs. Malheureusement, l'efficacité des traitements actuels (qu'ils soient médicamenteux ou par stimulation cérébrale) reste insatisfaisante. Ceci est lié à une mauvaise compréhension des mécanismes sous-jacents à la chronicisation de la douleur. Des approches multidisciplinaires nouvelles sont nécessaires pour pallier ce problème, en utilisant de nouveaux modèles animaux transposables à la recherche chez le patient. Ce projet de recherche vise, grâce à l'utilisation d'une nouvelle technique de neuro-imagerie (imagerie ultrasonore hyper-rapide, hypersensible), d'imager dans le cerveau de rongeurs 1) les zones cérébrales activées au cours de l'application d'une stimulation douloureuse. 2) Nous souhaitons étudier aussi les altérations de fonctionnement des réseaux cérébraux liées à la douleur persistante. 3) Une fois ces altérations décrites, nous souhaitons identifier les mécanismes moléculaires qui les sous-tendent de façon à les bloquer, en espérant bloquer la persistance de la douleur. Le but ultime de cette recherche est de mieux comprendre les changements observés chez l'homme et de mieux les traiter.

Le recours à l'utilisation d'animaux de laboratoire est nécessaire car ce projet nécessite une approche intégrée, de la molécule à l'imagerie, en passant par le comportement. Ce projet de recherche nécessite l'utilisation de modèles animaux de douleur persistante. Nous avons choisi les modèles les plus courts et les moins douloureux possibles. Un grand soin sera porté afin d'empêcher ou minimiser tout stress ou souffrance aux animaux, comme un suivi clinique journalier utilisant l'échelle validée par le comité d'éthique, les conditions d'élevage et enfin le modèle animal qui a été réfléchi afin de garantir le bien-être animal.

Le nombre d'animaux inclus sera le plus petit possible, tout en veillant à ce qu'il permette de réaliser une analyse statistique des résultats. Lorsque ce sera possible, des modèles utilisant des animaux anesthésiés seront préférés de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux douloureux. Ces travaux nécessiteront au maximum 60 rats et 120 souris (en y incluant les animaux contrôles ne recevant pas de stimulations douloureuses), pour une durée de 5 ans.

17330 Les tortues marines sont des espèces menacées au niveau mondial, et sont inscrites à ce titre à l'Annexe I de la Convention de Washington (CITES) et sur la liste rouge de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). Le sud-ouest de l'océan Indien (SOOI) abrite cinq des sept espèces de tortues marines (la tortue verte *Chelonia mydas*, la tortue imbriquée *Eretmochelys imbricata*, la

tortue olivâtre *Lepidochelys olivacea*, la tortue caouanne *Caretta caretta* et la tortue luth *Dermochelys coriacea*), et représente une région clef, au niveau mondial, pour la reproduction et l'alimentation de ces espèces. Seules deux de ces espèces fréquentent les côtes de La Réunion, la tortue verte et la tortue imbriquée, la première étant la seule à s'y reproduire.

La tortue imbriquée *Eretmochelys imbricata* est l'espèce de tortues marines la plus assujettie aux récifs coralliens sur lesquels elle se nourrit, et lesquels sont fortement soumis aux changements climatiques et à l'intensification des activités humaines en milieu littoral. A l'image des autres espèces, elle fréquente successivement des habitats hauturiers et côtiers au cours de son cycle de vie. Aussi, pour pouvoir fournir aux gestionnaires des données et connaissances pertinentes en vue de l'élaboration de plans de gestion efficaces, il est nécessaire de développer des approches régionales, multipartenaires et pluridisciplinaires.

A l'échelle de l'ouest de l'océan Indien, la tortue imbriquée se reproduit en saison chaude sur les plages continentales isolées et les îles. Les aires de développement et d'alimentation en mer ne sont par contre que très peu renseignées. Le projet vise à renforcer, à l'échelle locale de La Réunion et de l'ouest de l'océan Indien, les connaissances sur cette espèce classée en danger critique d'extinction. Par l'utilisation couplée de la biologie moléculaire et du suivi spatial et comportemental des populations, le projet vise deux principaux objectifs : i) comprendre la distribution spatiale, l'origine et la connectivité des populations de tortues imbriquées de l'ouest de l'océan Indien, et ii) comprendre l'utilisation et la fonctionnalité de leurs habitats. Pour y répondre plusieurs actions nécessitent la capture temporaire et la manipulation de tortues marines pour : l'identification individuelle par photo-identification, des mesures biométriques, des prélèvements de tissus par biopsies et le déploiement d'outils télémétriques (balises Argos) ou bio-loggers externes (caméra miniaturisées).

Les procédures expérimentales prévues suivent les recommandations du groupe de spécialistes des tortues marines (MTSG) de l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) et de la SSC (Species Survival Commission) en termes de standards de collecte et de manipulations des animaux. Une attention particulière sera portée au bien-être des animaux pendant toute la durée de l'application de ces procédures. Elles seront encadrées par des personnels titulaires des diplômes et certificats adaptés à la manipulation des animaux à des fins scientifiques et par des personnes disposant d'une expérience professionnelle de plusieurs années (10 à 30 ans) en relation avec ces espèces.

Si des captures/relâcher dans leur milieu naturel d'espèces menacées comme les tortues marines est potentiellement dommageable pour l'espèce, c'est justement ce caractère « menacé » qui justifie l'acquisition de connaissances par des prélèvements et du marquage individuel. Car sans connaissance sur l'origine et la distribution de grands migrateurs comme les tortues marines, et leurs besoins en termes d'espaces et de ressources naturelles, nous ne serons pas en capacité de proposer des mesures de conservation à la fois cohérentes et efficaces aux échelles locales et régionales.

Afin d'optimiser les protocoles expérimentaux, nous avons suivi la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

- Remplacer : il est impossible de remplacer les individus ciblés par un autre modèle expérimental, l'objectif même du projet étant d'acquérir des connaissances sur leurs populations pour améliorer leur préservation.

- 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 se basant sur la connaissance de la diversité génétique aux marqueurs considérés, il a été démontré qu'un lot de 30 individus était nécessaire. Dans le cas des tortues imbriquées de La Réunion, nous limitons à 30 le nombre d'individus échantillonnés, en raison de la taille plus réduite de la population au regard des tortues vertes (l'espèce ne représente qu'un tiers de la population de tortues marines recensée autour de l'île) ; les informations ciblées sur leur origine et écologie restent fondamentales et utiles car pourront être combinées aux données collectées sur d'autres territoires de la région.

- Raffiner : par la mise en place de procédures de capture adaptées (à la main, en bouteille, ciblage d'individus calmes et conciliants sans poursuite), et de maintien à bord optimales (ombre, linge humide,

vue cachée...); les procédures expérimentales proposées garantiront le bien-être des animaux et limiteront leur stress durant les différentes phases de manipulation.

17331 Le projet concerne l'élevage de poux de corps sur lapins. Les poux d'élevage sont des poux de corps humains qui ont été sélectionnés pour leur capacité à se nourrir de sang du lapin pour la survie et l'entretien de leur population. Le lapin est donc la seule espèce animale disponible pour cet élevage.

Dans le cadre de la recherche fondamentale et appliquée sur quelques ectoparasites et acaricides (acariens), notre élevage nous permet de mieux connaître les poux (comportement, aptitude à la survie, acquisition de résistance à certains produits) afin de mieux les combattre en conseillant et en testant l'efficacité pédiculicide et lenticide des produits anti-poux pour le compte de l'industrie pharmaceutique. L'élevage de poux nous permet donc de mieux les combattre en contribuant à la mise au point de certains modes opératoires en étroite collaboration avec les industries pharmaceutiques et à la diffusion des connaissances nécessaires à la lutte contre la pédiculose auprès des services scolaires, de santé et du public confronté à cette infestation (interventions dans les écoles, les centres aérés, conseils aux familles).

Pour cela nous utilisons 4 lapins sur une durée de 3 ans. Comme 2 lapins ont dû être sortis du protocole sur la période 2017-2020 à cause de pathologies indépendantes du nourrissage des poux, 2 lapins supplémentaires sont prévus afin de pallier à cette situation si celle-ci se représentait, soit 10 lapins pour les 5 années du projet dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Les poux de corps d'élevage se nourrissent exclusivement par nourrissage direct sur le lapin qui ne peut pas être remplacé par un nourrissage *in vitro*.

- Réduction : Dans l'idéal, les poux devraient être nourris chaque jour. Le nombre de repas est limité à 4 par semaine afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

- Raffinement : Les lapins sont hébergés en accord avec les directives européennes à 1 par cage pour éviter les comportements de dominance observés chez certains animaux, mais avec un contact visuel entre les 4 lapins. De plus, leur environnement est enrichi d'une tablette pour grimper ou se cacher et d'un bouchon de fibres pour se faire les dents. Le lapin utilisé pour le nourrissage des poux reçoit de la carotte de culture biologique en renforcement positif. A la fin des 3 ans, les lapins seront placés si possible par la PST Animaleries.

17332 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.

Le microbiote intestinal est un important réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. La colonisation intestinale par un organisme multirésistant aux antibiotiques peut évoluer d'un portage asymptomatique à diverses infections, principalement urinaires, digestives et sanguines. De plus, le transport digestif de ces bactéries résistantes peut entraîner une contamination de l'environnement et sa transmission à des sujets sains ou malades. Par conséquent, il est d'une importance majeure de diminuer et même de supprimer le transport digestif de bactéries multi-résistantes pour limiter sa propagation à d'autres personnes. Les inhibiteurs de la pompe sont des médicaments largement prescrits au niveau mondial (top 10 des médicaments les plus consommés). Ils sont connus pour altérer la composition du microbiote digestif. Plusieurs études observationnelles retrouvent un lien entre la consommation d'IPP et la colonisation digestive à des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Néanmoins, la limite de ce type d'étude observationnelle est qu'elles ne peuvent pas établir pas un lien de causalité entre l'exposition la conséquence. D'ailleurs une équipe de recherche n'a pas retrouvé cet effet dans un modèle murin visant à évaluer l'impact des IPP sur la colonisation à *Clostridium difficile* alors que les études observationnelles trouvaient une association entre ces deux paramètres. Une seule étude sur un modèle murin a montré que l'utilisation des IPP facilitait le passage gastrique de bactéries résistantes et donc la colonisation digestive. Par contre cette étude n'a pas évalué la persistance de ce portage digestif à plus long terme (souris sacrifiées à 3 jours après l'exposition à la bactérie résistante). Notre modèle murin de colonisation digestive développé au sein de notre laboratoire suggère que l'utilisation d'IPP favorise non seulement le passage digestif des bactéries résistantes mais aussi leurs persistances dans le temps au sein du tube digestif. Néanmoins ces données préliminaires ne peuvent être exploiter pour établir ce lien entre colonisation et IPP car aucun schéma ne visait à comparer l'utilisation des IPP à un groupe contrôle.

Notre objectif de travail est donc de tester l'impact des IPP sur le portage digestif de bactéries multirésistances. Pour cela nous testerons différents schémas thérapeutiques mimant au plus près les conditions à risque de colonisation par ce type de bactéries des patients à l'hôpital et évaluerons le rôle des IPP dans le maintien et la diffusion des micro-organismes résistants aux antibiotiques.

Nous utiliserons 144 souris SWISS mâles 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 gavage gastrique 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.

17333 Le glioblastome est une tumeur du cerveau très agressive, avec un pronostic sombre. La survie médiane est inférieure à 15 mois malgré une opération chirurgicale et un traitement par radiothérapie et chimiothérapie. De nouveaux traitements se sont avérés capables de stimuler le système immunitaire des patients contre certains cancers et ainsi d'améliorer la survie de ces patients. Ces nouveaux traitements, appelés immunothérapies, pourraient prolonger de manière significative la survie des patients atteints de glioblastome. Différents types d'immunothérapie contre le glioblastome sont en cours de développement, notamment des vaccins thérapeutiques avec le but de stimuler les défenses immunitaires du patient contre les cellules du cancer.

Plusieurs approches vaccinales anti-tumorales ont été développées, mais avec des résultats insuffisants chez l'Homme lors des essais cliniques. Récemment, un nouveau vaccin a été découvert, utilisant la mélanine comme l'un des composants du vaccin. Il s'agit de la même molécule présente naturellement dans la peau chez l'Homme, mais produite en laboratoire. La mélanine naturelle est déjà connue pour son rôle de protection de la peau contre les rayons UV mais aussi contre des agents pathogènes qui pénètrent dans la peau et sont attaqués par les mélanocytes, les cellules qui produisent la mélanine. Le vaccin est constitué d'un composant du cancer (une partie d'une protéine appelée peptide) et deux composants capables d'amplifier la réponse au vaccin : la mélanine et un autre composant appelé CpG. Le vaccin à base de mélanine a permis en effet d'obtenir une très forte réponse contre la tumeur et conséquemment une inhibition de la croissance tumorale dans plusieurs modèles cancéreux chez la souris, en se révélant beaucoup plus efficace que les meilleurs vaccins actuellement

disponibles. Le vaccin à base de mélanine est actuellement en cours d'évaluation chez l'animal dans le traitement du glioblastome.

Le présent projet vise à évaluer la pénétration de la mélanine dans les différents organes après injection par voie sous-cutanée du vaccin afin d'explorer les mécanismes stimulant les défenses immunitaires au niveau local et général de la mélanine ainsi que ses éventuels effets secondaires. La procédure d'injection n'est pas douloureuse pour l'animal mais sera réalisée sous anesthésie gazeuse pour permettre l'immobilité de l'animal.

Pour ce projet nous évaluerons la répartition tissulaire de la mélanine chez la souris grâce au [18F] MEL050, une molécule qui se lie de manière spécifique et avec une affinité élevée à la mélanine *in vivo*. Les souris feront l'objet d'un examen d'imagerie à différents temps (48 heures, 7 jours et 14 jours) après l'injection sous-cutanée des différents vaccins à base de mélanine testés. Dans le respect de la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement), ce projet ne permet pas le Remplacement puisque l'étude chez l'animal est indispensable pour analyser la distribution d'une substance, et la souris est le plus petit mammifère pouvant faire l'objet d'un examen d'imagerie par TEP/TDM (Tomographie par Emission de Positons / Tomodensitométrie). De plus, la souris présente une anatomie proche de celle de l'Homme. Concernant la Réduction du nombre d'animaux, les souris feront l'objet d'un examen d'imagerie avant et après l'injection du vaccin et tout au long du suivi prévu jusqu'à 2 semaines. Elles seront donc leur propre témoin permettant ainsi de réduire le nombre de souris nécessaire. Le devenir de la mélanine dans l'organisme des souris sera exploré après injection du vaccin complet (peptide + mélanine + CpG) et comparée à 3 conditions : contrôle négatif avec vaccin sans mélanine (peptide + CpG), mélanine seule et mélanine + CpG soit 4 groupes expérimentaux de 14 souris chacun. Au total, un maximum de 56 souris sur 3 ans sera utilisé dans ce projet. Une fois les souris euthanasiées aux différents temps, les organes d'intérêt (ganglions, rate, reins, foie, cœur, cerveau) seront prélevés pour étudier l'accumulation de mélanine par colorations anatomopathologiques. Les protocoles seront optimisés en utilisant des modèles validés par la littérature, donnant des résultats reproductibles, et les expériences seront conduites dans les conditions respectant au mieux le bien-être des animaux. Leurs cages feront l'objet d'enrichissement afin de limiter le stress potentiel lié aux procédures expérimentales.

Un suivi rigoureux et régulier des animaux sera également 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. Pendant les procédures d'imagerie les souris seront anesthésiées et leur thermorégulation assurée par un lit chauffant. 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 euthanasiées selon les points limites, sans délai d'attente. Toutes les souris seront euthanasiées deux jours après la dernière imagerie TEP, soit 16 jours après le début des expériences.

17334 Notre intérêt pour l'immunothérapie a explosé ces dernières années grâce à l'apparition de nouveaux types de traitement. Ces traitements sont capables de permettre la mise en place d'une réponse de longue durée contre le cancer mais chez un nombre limité de patients. Un autre traitement appelé anti-VEGF empêche la création de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur, limitant ainsi la croissance tumorale en la privant des nutriments et de l'oxygène apportés par le sang. Plusieurs études ont montré que l'anti VEGF était également capable d'augmenter l'efficacité des traitements d'immunothérapies. Cependant, les mécanismes permettant d'expliquer cette amélioration restent encore à découvrir et plus particulièrement ceux impliquant les cellules du système immunitaire, nos fameux globules blancs. C'est pourquoi nous souhaiterions étudier l'efficacité de cette association de traitements dans des souris portant différents types de tumeurs afin de déterminer les meilleurs modèles d'études.

Après l'injection de cellule tumorales dans la patte, la croissance des tumeurs sera mesurée trois fois par semaines, et traitées par l'immunothérapie en association ou non avec l'anti VEGF, afin de pouvoir discriminer les effets de chacun des traitements. Dix jours après l'injection, lorsque la tumeur est mesurable, les souris seront traitées avec un contrôle, ou une immunothérapie en association ou non avec un anti-VEGF. La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. De plus,

nous avons fait appel à une méthodologiste afin de déterminer au mieux le nombre minimal de souris requis pour que nos tests statistiques soient suffisamment puissants, ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux contrôle et donc le nombre total d'animaux de l'étude. Des études préliminaires ont été réalisées sur les cultures de cellules *in vitro* limitant ainsi l'utilisation d'animaux (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant un inconfort potentiel des animaux (injections sous-cutanées des tumeurs) seront réalisées sous anesthésie, les souris bénéficieront de cages enrichies en jouet et elles seront habituées aux méthodes de contention et aux mesures par pied à coulisse avant le début de l'expérimentation permettant ainsi le raffinement de l'étude. Cette étude nécessitera 240 souris C57Bl6 et 120 souris Balb/C.

17335 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 rats. Ces anticorps sont destinés à être utilisés dans des applications en recherche.

Le rat est l'animal de laboratoire 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.

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 rats sont observés tous les jours

En fonction des demandes que nous recevons nous prévoyons d'utiliser jusqu'à 10 rats par an, 50 rats sur 5 ans.

17336 L'objectif de ce projet est d'optimiser des schémas d'associations d'inhibiteurs de MEK (iMEK, Mitogen-activated Extracellular signal- regulated Kinase) délivrés en per OS associés ou non avec des CT (chimiothérapies) administrées en IP ou IV ou IT avec différents schémas de fractionnement de radiothérapie (RT) (nombre de séances de rayons). Les iMEK sont actuellement développés en oncologie pour leur action pour stopper la croissance des tumeurs en stoppant la multiplication des cellules.

Lors d'une étude préliminaire *in vitro* nous avons observé que l'association d'iMEK et RT ou CT pouvait induire l'expression de gènes associés à l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Nous pensons donc qu'il y a un intérêt à associer ces trois types de thérapeutiques pour profiter à la fois de leur action directe sur les cellules tumorales mais aussi pour leur action sur l'activation du système immunitaires pour reconnaître et tuer les cellules tumorales.

L'objectif de cette étude est d'évaluer pour plusieurs modèles de tumeurs syngéniques d'origines colique, pulmonaire, ovaire ou mélanome l'effet de trois types de fractionnement de la RT (en 1, 3 ou 18 fractions) associés à des iMEK et à des CT sur le recrutement et l'activation de cellules immunitaires au sein de la tumeur. Dans un second temps nous évaluerons l'efficacité des associations RT / CT /

iMEK en terme de réponse tumorale en analysant la croissance des tumeurs après chaque type de traitements combinés.

Les modèles tumoraux syngéniques évalués seront greffés sur le flanc droit de souris immunocompétentes Balb/c ou C57 BL/6 selon les modèles de tumeurs étudiées. Les associations seront donc évaluées sur 4 modèles différents avec l'utilisation de 2304 animaux pour la totalité de l'étude).

Pour chaque modèle, l'analyse de l'expression des cibles et l'infiltration de tumeurs par les cellules immunosuppressives après RT +/- CT +/- iMEK à partir d'échantillons biologiques (sang, tumeurs...) prélevés à J0 et J7 après traitement sur des souris iMEK ainsi que l'évaluation de la croissance tumorale nécessitera 576 souris.

Les souris seront réparties par groupes de 10 individus. 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.

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. Cependant les modèles tumoraux utilisés dans cette étude auront été sélectionnés *in vitro* pour induire une augmentation de l'expression du gène cxcl10 après l'association des traitements à l'étude. Les souris seront maintenues dans des cages de 10 individus en présence d'enrichissement. Les irradiations seront réalisées sous anesthésie gazeuse et aucune toxicité n'est attendue aux doses utilisées. Les injections de chimiothérapies seront réalisées en IP ou en IV ou en IT, 1 fois par semaine durant trois semaines. Les injections de iMEK seront réalisées vigiles en per os une fois par jour durant 8 jours consécutifs. Les traitements par iMEK 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 et 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/iMek/CT optimisé sur le fractionnement de la RT et son effet sur la réponse immunitaire.

17337 Les maladies cardiovasculaires sont l'une des principales causes de décès des personnes atteintes de diabète de type 2 ou d'obésité. Plusieurs études scientifiques ont montré un lien de cause à effet entre l'apparition de ces pathologies et la consommation excessive de sucre. C'est pourquoi, l'utilisation de substituts de sucre, les édulcorants (NNS) est en augmentation. L'utilisation de ces édulcorants tout en remplaçant la saveur sucrée n'entraîne pas d'augmentation de la glycémie à court terme. Cependant, des études récentes ont démontré un effet des NNS sur le métabolisme du glucose. Consommés régulièrement ces NNS peuvent provoquer une augmentation de la prise alimentaire et par voie de conséquence une augmentation de la glycémie à long terme. De plus, il a été montré que la consommation de NNS sur une courte période pouvait diminuer la sensibilité à l'insuline en réponse à un test de tolérance au glucose réalisé chez des sujets sains. Ces changements métaboliques pourraient entraîner un mauvais fonctionnement cardiovasculaire notamment par l'intermédiaire des récepteurs T1Rs au goût sucré. Ces récepteurs sont retrouvés sur la langue mais aussi dans tout l'organisme et en particulier sur les vaisseaux sanguins et l'hypothalamus. L'objectif de ce projet sera déterminer le rôle de de l'hypothalamus en mesurant l'activation des neurones en réponse à une injection de NNS dans la carotide gauche en direction du cerveau et de montrer une implication des récepteurs T1Rs hypothalamiques. Un ensemble de marqueurs sanguins sera dosé tel que les catécholamines, reflet du fonctionnement du système sympathique qui peut affecter la réactivité vasculaire. 30 souris C57Bl6J seront utilisées pour ce projet sur durée d'un an.

Remplacement : l'étude des variations de la glycémie et de marqueurs du métabolisme glucidique et lipidique ne peut être réalisé que sur des animaux vivants. Réduction : le nombre d'animaux sera réduit au minimum 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%). Raffinement : Depuis l'arrivée des animaux au laboratoire, tout est mis en place pour réduire la souffrance et l'angoisse des animaux. Lors des expérimentations réalisées sous anesthésie générale, les animaux seront au préalable sédatisés puis recevront une dose d'analgésique morphinique. Les doses et les produits utilisés le sont sur les conseils du vétérinaire référent du laboratoire.

17338 La douleur est une sensation désagréable mais utile permettant de détecter et d'éviter les stimuli potentiellement nocifs pour notre organisme. Cependant dans certains cas cliniques, tels qu'une inflammation ou une lésion nerveuse, la douleur perd sa fonction protectrice et devient invalidante.

Une sous-population de neurones sensoriels, appelés nocicepteurs, détecte les stimuli nocifs en périphérie (peau, muscles, viscères...) et les transmet aux cornes dorsales de la moelle épinière par la libération de glutamate et de neuropeptides. La libération de neuropeptide joue un rôle fondamental dans la transmission des informations nociceptives et le développement des états de douleurs. Nous disposons d'une lignée de souris génétiquement modifiée pour lesquelles cette libération de neuropeptides est altérée. L'objectif de notre projet est d'étudier l'impact de cette altération de la libération de neuropeptides sur la transmission des informations nociceptives et les comportements nociceptifs et douloureux.

Le projet nécessitera 780 animaux et 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. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés, chaque procédure regroupe un ensemble de tests comportementaux dont l'enchaînement est compatible avec le bien-être de l'animal, ce qui permet de réduire grandement l'effectif.

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 manipulations plurihebdomadaires, permettant une habituation aux manipulations et une réduction du stress. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générales. Pour chacune des procédures concernées, des points limites sont définis à l'aide de plusieurs paramètres dénotant la souffrance des souris. En cas de nécessité des décisions seront prises en accord avec le vétérinaire, la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux (SBEA) et/ou le personnel zootechnique de l'institut pour stopper tout signe de mal-être de l'animal.

Remplacer : Au vu de notre objectif 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 nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

17339 - Contexte scientifique - La vision est une entrée sensorielle majeure pour guider nos actions et notre perception. Cependant, comprendre le traitement neuronal sous-tendant ces fonctions reste un défi majeur. Imaginons, par exemple, de devoir suivre du regard un objet en mouvement qui passe derrière un objet plus large, le tout dans un environnement pluvieux. Une telle tâche, apparemment réalisée sans difficulté, nécessite une ségrégation des divers signaux de mouvement. Pour résoudre ce problème, notre système visuel doit combiner les signaux sensoriels avec des connaissances à priori, et ce, à plusieurs échelles spatiales et temporelles. Depuis 50 ans, les neurosciences en vision ont accumulé un grand nombre de connaissances mais principalement sur la base d'étude de neurones individuels à une échelle restreinte. Or il apparaît clair que les traitements opérés par le système visuel sont distribués et en interaction constante au sein d'une même aire et entre plusieurs aires corticales.

- Objectifs du projet - L'objectif du projet de recherche présenté dans cette saisine est de mieux comprendre les opérations neuronales qui relèvent ces défis à l'échelle mésoscopique (entre le

microscopique, le neurone, et le macroscopique, le cerveau en entier). Pour ce faire, nous utilisons le modèle primate non-humain (PNH) éveillé ou anesthésié, qui se rapproche le plus de la vision chez l'homme. Sur ce modèle, nous enregistrons l'activité neuronale dans différentes aires du cortex visuel au niveau de l'activité de population neuronale avec une grande résolution spatiale, temporelle sur une large surface corticale. Les techniques utilisées seront l'imagerie optique à champ large, les matrices d'électrodes et la microscopie multi-photons. L'accès à ces données va nous offrir l'opportunité de mieux comprendre comment l'information visuelle est intégrée, représentée au niveau de la population neuronale et modulée pour sous-tendre la construction des perceptions.

- Bénéfice potentiel pour la société – La réalisation de ce projet va nous permettre de comprendre comment le cerveau intègre et représente l'information visuelle. Le premier apport pour la société est donc un apport de connaissance fondamentale. Le second est pour l'aide au développement de prothèses rétinienne. Effectivement, nos connaissances fondamentales sur les capacités représentationnelles du système visuel sont utilisées pour aider au développement de la vision artificielle prothétique. Nous avons déjà contribué dans cette direction et avons démontré l'intérêt de l'utilisation d'un modèle animal maîtrisé pour tester et améliorer les prothèses rétinienne.

- Description du projet et règle des 3R –

REMPLE : Pour ce projet, nous travaillerons pendant 5 ans sur le PNH. Le choix de l'espèce est dicté par la thématique de notre projet. En effet, aucune autre espèce n'a un système visuel suffisamment proche de l'humain, notamment avec une hiérarchie des aires corticales identiques, une vision diurne, une vision des couleurs trichromatique ainsi qu'une sensibilité psychophysique identique. Afin de minimiser le recours aux animaux, nous travaillons sur l'amélioration des techniques d'enregistrement ainsi que sur les méthodes computationnelles permettant de perfectionner le traitement des données et d'extraire le maximum d'information pour chaque animal utilisé.

REDUIRE : Dans ce projet, nous développerons en parallèle différentes approches pour optimiser la collecte de données par rapport au nombre d'animaux utilisés :

Le modèle classiquement utilisé au laboratoire est le macaque rhésus sur lequel nous poursuivons nos projets.

1) Macaque rhésus éveillé, dans une tâche de fixation. Sur ces animaux nous enregistrerons l'activité cérébrale par imagerie optique et/ou matrice d'électrode chroniquement implantée.

2) Dans le cas où nos explorations fonctionnelles nécessitent plus d'essais avec un meilleur signal-sur-bruit, nous travaillerons sur une préparation macaque rhésus anesthésié en semi-chronique.

En parallèle, nous désirons développer le travail le marmouset. Le marmouset nous permettra de travailler sur une espèce PNH qui possède 3 avantages significatifs pour notre projet : (i) un système visuel et un comportement restant proche de celui de l'homme ; (ii). L'animal est lissencéphale, ce qui va nous d'étudier l'ensemble du système visuel (de V1 à V5), contrairement au rhésus; (3) c'est une espèce qui se reproduit rapidement et pour laquelle des outils génétiques sont déjà accessible (Brain/MINDS project Japon).

3) En situation anesthésiée, nous pourrions imager le cortex en microscopie biphoton et mesurer les dynamiques d'activité corticale en parallèle dans 5 aires visuelles corticales (de V1 à V5).

4) Nous envisageons de travailler sur le marmouset éveillé, ce qui nous permettrait de diminuer le nombre d'animaux (de nombreuses acquisitions de données chez le même animal).

Le nombre d'animaux dont nous aurons besoin n'est pas le même en fonction (i) de l'animal (macaque vs marmouset) et (ii) et de l'état de veille (éveillé vs anesthésié). Voir Tableau 1.

En situation éveillée (1 et 4), nous estimons le besoin à 6 macaques et 12 marmousets, car nous avons besoin de 2(4) macaque (marmouset) par publication et que les données nécessaires à la publication d'un article se collectent au mieux en 1 an, à cela il faut rajouter le temps de travail pour publier, d'au moins 6 mois. Nous avons donc compté 2 macaques x 3 et 4 marmouset x 3).

En situation anesthésiée (2 et 3), 3 rhésus et 6 marmousets sont nécessaire pour publier. Nous avons donc estimé avoir besoin de 9 macaques et 18 marmousets (3x3 et 6x3).

Nous combinerons plusieurs questions scientifiques par animal et ainsi réduire le nombre d'animaux nécessaires.

RAFFINER : Dans l'ensemble de ces approches, la prémédication, anesthésie, analgésie, suivi et soins post-opératoires se feront systématiquement sous contrôle d'un vétérinaire ou un ingénieur d'étude en expérimentation animale. A noter que les méthodes d'imagerie photonique ont l'avantage d'être moins invasifs que l'électrophysiologie classique car ne pénétrant pas dans le cerveau. Dans la configuration (1), nous devons implanter un plot de tête, mais nous travaillons à raffiner cette partie pour remplacer le plot de tête par un masque.

17340 L'inflammation est la réaction du système immunitaire suite à une agression externe (ex : infection, traumatisme.) ou interne (cancer, prion-like...). Ce processus fait intervenir deux types d'immunité : immunité innée et immunité adaptative

Dans certaines pathologies l'inflammation devient chronique et participe à son évolution. C'est le cas dans certaines pathologies neurodégénératives. En effet plusieurs études démontrent la participation de l'inflammation dans des maladies comme la maladie de Parkinson, MSA, Alzheimer, la maladie de Charcot. Les maladies neurodégénératives souffrent d'une absence de prise en charge thérapeutique, accentuée par un vieillissement de la population. Ce projet permet d'identifier et caractériser des mécanismes d'action de cibles d'intérêts et de vérifier leur efficacité sur l'animal tel que les souris saines, jeunes ou âgées. En effet le recours à l'animal de laboratoire présente un intérêt scientifique majeur pour le suivi et l'étude de biomarqueurs dans des fluides et structures d'intérêts tel que le liquide céphalo-rachidien, sérum.

Afin de pouvoir évaluer l'implication de phénomènes inflammatoires dans ces maladies nous modélisons chez la souris des mécanismes retrouvés chez le patient. Les modèles animaux ainsi développés nous permettent de pouvoir évaluer l'activité de nos composés et de vérifier l'effet thérapeutique par des dosages biochimiques. Pour cela nous injectons des toxines inflammatoires par les voies systémiques classiques (IP, Oral, IV, sous cutanée, IM) chez l'animal afin que celles-ci entraînent une réponse immunitaire et inflammatoire. L'efficacité des produits sera testée, dans ces modèles inflammatoires, suite à leur administration par voies systémiques (IP, IV, Oral, Sous cutanée), Des prélèvements seront effectués en fin d'étude pour analyses.

L'ensemble de ces procédures peut entraîner un stress, une hypomobilité, une baisse de température transitoire (quelques heures) pouvant conduire à un degré de gravité modéré. Une hypomobilité durable 24h après administration de la toxine entraîne l'euthanasie de ces animaux, entraînant un degré de sévérité modéré. Une surveillance quotidienne par du personnel compétent et formé aux observations de signes cliniques, permettra de détecter et soulager tout inconfort de l'animal.

Afin de limiter le recours aux animaux, les composés sont sélectionnés préalablement sur les résultats obtenus dans des modèles *in vitro* ou également par modélisation informatique. Mais cette modélisation ne permet pas de rendre compte de la complexité de ces pathologies. Elle permet de valider des cibles mécanistiques et de présélectionner les meilleurs candidats médicaments. Pour être au plus proche des pathologies humaines, il faut évaluer la complexité et l'interaction de l'intégralité des systèmes biologiques, les barrières physiologiques et les voies métaboliques, ce qui ne peut se faire que chez l'animal.

Nous nous attachons à réduire l'usage des animaux, avec le support des analyses statistiques réalisées par nos experts biostatisticiens permettant ainsi d'optimiser les effectifs selon les profils des études. Le biostatisticien sera consulté pour optimiser le design à utiliser en fonction de l'objectif et des contraintes de l'étude (nombre de groupes, type de comparaisons, présence de répétitions), de la variabilité des paramètres mesurés, de la taille des effets à mettre en évidence et de l'historique des données La manipulation des animaux, les techniques d'administration et de prélèvements sont réalisés selon les bonnes pratiques vétérinaires. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux avec enrichissement adapté à l'espèce avec une interaction quotidienne avec le personnel. Les gestes techniques d'administrations et de prélèvements peuvent provoquer un inconfort léger et de courte durée, réduit au minimum par le choix des volumes et rythme d'administration.

A la fin de la procédure, les rongeurs sont euthanasiés, puis des prélèvements terminaux peuvent être faits. Le nombre maximum d'animaux utilisés par le projet est estimé à 4200.

17341 Ce projet constitue une étude comparée, entre l'homme et le primate non-humain, des mécanismes cérébraux de la communication vocale. Par exemple, la reconnaissance des vocalisations de ses congénères et de leur identité est une faculté que l'on partage avec les primates non humains. Ceci n'est pas surprenant compte-tenu de l'importance de telles capacités cognitives pour créer et maintenir des interactions sociales. Sans compter l'impact d'une telle étude sur notre connaissance des processus cérébraux de la communication et de ses dysfonctionnements (autisme, prosopagnosie, phonagnosie...), ce projet participerait grandement à la recherche sur les origines du langage, aujourd'hui en plein essor. Le langage humain se serait-il développé à partir d'une communication non verbale plus primitive ? Pour répondre à une telle question il est nécessaire de distinguer ce qui est spécifique à l'homme de ce qui est aussi présent chez des espèces phylogénétiquement proches, tels que les primates.

L'IRM fonctionnelle est une méthode qui a fait l'objet de nombreuses publications sur la perception de la voix chez l'homme. Nous avons pour objectif d'utiliser cette technique d'imagerie cérébrale non-invasive chez le macaque Rhésus (n=5) éveillé, dans un protocole de stimulation auditive passive. Le macaque Rhésus est une espèce très utilisée en Neurosciences, notamment parce que ces animaux possèdent des systèmes perceptifs visuel et auditif globalement similaires à ceux de l'homme tant sur le plan structural que fonctionnel. Nos résultats en IRM fonctionnelle pourront être confrontés avec ceux obtenus chez l'homme et ainsi permettre comparaisons inter-espèces des régions cérébrales de traitement de l'information vocale. Une fois ces régions identifiées chez l'animal, nous implanterons de manière permanente des matrices multi-électrodes dans les trois régions présentant le maximum d'activation IRMf. Ces matrices permettront d'enregistrer l'activité de petites populations de neurones et les potentiels d'activation locaux pendant l'écoute de stimuli vocaux ou non-vocaux. Les analyses révéleront si la préférence observée dans ces régions pour les stimuli vocaux est également observable au niveau neuronal et permettront d'étudier comment l'identité du locuteur est représentée à travers ces régions.

Notre projet satisfait aux exigences de raffinement et de réduction de l'expérimentation animale notamment grâce aux points suivants :

Utilisation d'une technique non invasive (IRM) et d'une technique d'électrophysiologie ne nécessitant pas de plot de fixation de la tête de l'animal.

Utilisation d'un modèle animal (macaque Rhésus) indispensable du fait de sa proximité avec l'homme malgré des différences comportementales/ Intérêt majeur pour l'étude de l'origine du langage/ Littérature importante concernant l'anatomie cérébrale du macaque permettant une comparaison plus aisée avec l'homme.

Réalisation d'un protocole d'entraînement adapté afin de minimiser le stress de l'animal.

Entraînement par renforcement positif

Exposition limitée aux produits anesthésiants car pratique de l'IRMf chez l'animal éveillé (et sans aucun traitement douloureux). Par ailleurs, si l'entraînement n'aboutit pas, une anesthésie minimale sera envisagée afin d'éviter un entraînement abusif, stressant pour l'animal et inutile pour notre étude.

Réduction du nombre d'individus utilisés au minimum nécessaire pour publier les travaux et réaliser des tests statistiques.

Utilisation d'animaux ayant déjà participé à des expérimentations dans d'autres équipes de recherche.

Exploitation maximale du temps expérimental (dans le scanner) en réalisant plusieurs techniques de traitement (imagerie anatomique, fonctionnelle et de diffusion)

La règle de remplacement ne s'applique pas dans notre cas puisque l'intérêt est justement d'étudier le modèle animal le plus proche de l'homme. De plus, des modèles mammifères moins « évolués » ne seraient pas adéquats, par manque crucial de littérature sur ce sujet d'une part, et par des incompatibilités techniques d'autre part.

17342 Le déclin important du nombre d'amphibiens et l'augmentation du nombre d'espèces menacées dans le monde nous poussent à réfléchir à des moyens de préserver ces populations en danger et de développer des méthodes de conservation et de techniques fiables pour répondre à ce défi écologique. Les programmes de conservation actuels sont axés sur la cryopréservation de gamètes et nécessitent pour chaque amphibien étudié, la mise au point de conditions spécifiques à l'espèce pour obtenir des paramètres de cryoconservation permettant de garantir la préservation du matériel génétique mais aussi la motilité des spermatozoïdes au dégel. Ce point limitant ne facilite pas la mise en place de programmes transversaux de conservation, pouvant être élargis à un grand nombre d'espèces.

Dans ce projet, nous voulons tester la transposition, à des fins de conservation, d'une méthode réservée jusque-là pour réaliser la transgénèse germinale chez *Xenopus laevis*. Basée sur une procédure simple de cryoconservation du sperme, le principe de cette technique est de préparer des noyaux de spermatozoïdes qui seront ensuite injectés mécaniquement dans des ovocytes non fécondés, permettant ainsi une fécondation efficace et le développement de larves issues de cette procédure. Notre objectif est d'évaluer si cette méthode peut être efficacement transposée à différentes espèces d'amphibiens anoure et urodèle.

Les procédures au nombre de 4, portent sur la production et la collecte de gamètes chez le mâle et la femelle de xénopes et d'axolotl. La collecte de semence sera réalisée selon 2 méthodologies : La semence sera collectée après injection d'hCG pour permettre la production et la collecte de laitance ou « urine spermique » (T0), suivie de collectes chirurgicales (T0+7 jours) par hémi-castrations chez le xénope (PROCÉDURE 1) et chez l'axolotl (PROCÉDURE 2). D'autre part des stimulations hormonales seront réalisées chez des femelles (injection d'hCG) pour récupérer des œufs non fécondés, chez le xénope (PROCÉDURE 3) et chez l'axolotl (PROCÉDURE 4), afin de réaliser les tests de fécondation à partir des gamètes congelés.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet et justification :

Trois espèces d'amphibiens dont les conditions d'élevage sont bien maîtrisées en laboratoire, seront étudiées (*Xenopus laevis* et *tropicalis* pour les anoures ; l'axolotl *Ambistoma mexicanum* pour les urodèles).

Pour chacune des 3 espèces, 10 mâles seront utilisés pour récupérer la semence après stimulation puis les testicules par hémi-castration et réaliser les cryoconservations de noyaux de spermatozoïdes. Des préparations individuelles de gamètes à partir de ces 10 mâles nous permettront de tester la variabilité individuelle vis-à-vis de la méthodologie de cryoconservation.

Pour tester la fécondance de la semence/noyaux après décongélation, 20 femelles pour chaque espèce seront utilisées. Ces femelles pourront être réutilisées (après un minimum de 4 mois de récupération entre chaque induction de ponte) de manière à tester l'efficacité des préparations au cours du temps pendant les 5 ans consacrés à ce projet. Un échantillon sera décongelé dans les 24h après la congélation et constituera le point de référence pour l'efficacité de fécondation et de développement des larves. Ensuite, des décongélation seront réalisées après 6 mois et 5 ans. Des comparaisons sur les efficacités de fécondation post congélation en fonction du temps de conservation seront réalisées entre les trois espèces.

Ainsi dans ce projet, 3 x 10 mâles et 3 x 20 femelles seront utilisés.

Avantages du modèle amphibien :

Les amphibiens ont un développement externe, ce qui favorise les études sur la reproduction et le suivi du développement embryonnaire et larvaire. Les 3 espèces choisies pour effectuer les tests sont de très bons modèles pour évaluer le principe de la transversalité de la méthode de cryoconservation et pourra ensuite être étendue à des programmes de conservation pour diverses autres espèces d'amphibiens anoure ou urodèle.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R :

- Remplacement : Il n'existe pas d'approche alternative permettant le remplacement du modèle animal dans notre contexte expérimental.

- Raffinement : Les amphibiens sont maintenus à une densité faible pour éviter tout stress dû à une surpopulation ou un isolement. Les animaux ainsi que les paramètres de l'environnement (température/salinité/nitrate/nitrite/pH) sont surveillés régulièrement.

Une approche de collecte non invasive de semence est développée en parallèle de la technique d'hémi-castration sur les mêmes individus pour permettre une comparaison entre les deux méthodologies. Les chirurgies (hémi-castrations) sont réalisées sous anesthésie avec du MS222 ainsi qu'une analgésie pour prendre en compte la douleur. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien post opératoire.

- Réduction : Le nombre de 10 mâles par espèce a été déterminé afin de pouvoir évaluer la variabilité individuelle de la cryotolérance dans le processus de cryoconservation.

Les femelles utilisées pour produire les œufs qui serviront à réaliser les fécondations seront réutilisées en respectant un minimum de 4 mois de repos entre deux inductions, permettant de réduire le nombre total d'individus utilisés dans ce projet.

17343 La protéine STING (Stimulator of Interferon Genes) est un acteur central dans la réponse du système immunitaire en cas d'infections et de cancers. En réponse à ces situations, STING induit l'expression de molécules appelées interférons (IFNs), qui vont déclencher une réponse immunitaire après s'être fixés sur leur récepteur appelé IFNAR. Des mutations du gène codant pour la protéine STING, modifiant sa séquence de telle sorte à conduire à une activation exagérée de STING, ont été décrites chez des patients atteints d'une maladie autoinflammatoire appelée SAVI (STING Associated Vasculopathy with onset in Infancy), avec une production d'IFN au dessus de la normale. Les patients SAVI ont des signes variables d'inflammation, avec une croissance et une survie réduites. Ils présentent fréquemment une baisse du taux de lymphocytes (cellules du système immunitaires faisant partie des globules blancs) dans le sang. A l'heure actuelle, les mécanismes conduisant au développement de cette maladie sont mal connus. Ceci nous a conduit à générer un modèle murin Knock-In (modèle STING gain de fonction ou GOF), portant la mutation la plus fréquemment décrite chez les patients atteints de SAVI (mutation W154M hétérozygote). Ce modèle murin a été généré sur fond C57BL/6 (B6). Par ailleurs, ces souris mutées dans la protéine STING ont été croisées avec des souris n'exprimant pas le récepteur IFNAR mentionné plus haut (souris IFNAR KO également sur B6). Ce croisement nous permet de mieux comprendre le rôle des IFN I dans la maladie développée par les souris. Notre modèle murin STING GOF (que ce soit sur fond sauvage ou sur fond déficient en IFNAR) développe un déficit immunitaire, avec une baisse du nombre de lymphocytes. Ceci conduit à une baisse de leur survie, nécessitant une surveillance. Les données scientifiques que nous obtiendrons grâce à l'étude de ces souris sont très importantes pour trouver de nouveaux traitements pour les patients atteints de SAVI, d'une part, et pour mieux comprendre le rôle de STING dans la réponse immunitaire. En conclusion, les souris présentant la mutation de STING (que ce soit sur fond génétique sauvage ou sur fond déficient en IFNAR) présentent donc un phénotype dommageable qu'il convient de surveiller lors de l'élevage. L'objet de cette demande est donc le maintien de la lignée STING GOF à phénotype dommageable. Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés est appliquée pour répondre aux différentes questions du projet scientifique. Un nombre total de 2471 animaux est nécessaire et comprend les animaux pour accouplements et les animaux issus des accouplements et nécessaires pour l'expérimentation pour le projet scientifique associé. Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs dans des cages de taille réglementaire, en ne dépassant pas le nombre maximal autorisé de souris par cage (souris rassemblées en groupes sociaux), et dans des cages comportant des enrichissements (nids). Enfin, les souris seront observées quotidiennement selon une grille de scores, et les dispositions adéquates seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites fixés et prédictifs. 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 des modèles *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.

17344 Ce projet de recherche vise à identifier les circuits neuronaux participant au développement de troubles cérébraux, en mettant l'accent sur la dépendance aux substances d'abus.

Ce projet est centré sur les récepteurs aux opiacés. Le système opioïde est un système neuromodulateur complexe composé de trois récepteurs (mu, delta et kappa) activés par des peptides opioïdes endogènes. Le système opioïde régule la douleur, les processus de récompense, la régulation des réponses émotionnelles et des réponses au stress. Les altérations de ce système sont centrales dans le développement de troubles addictifs et de l'humeur. L'objectif de ce projet vise à déterminer les fonctions des neurones exprimant les récepteurs aux opiacés dans différentes régions cérébrales.

Un nombre maximum de 216 souris sera utilisé pour l'ensemble du projet.

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 pour minimiser au maximum l'inconfort des animaux tout en permettant néanmoins d'étudier les propriétés addictives des opiacés.

"Remplacement" : les effets comportementaux des opiacés ne peuvent pas être étudiés en utilisant des modèles cellulaires, qui par nature ne récapitulent ni la complexité de l'organisation cérébrale en réseaux neuronaux complexes. L'étude de ces effets nécessite donc l'analyse d'organismes vivants et entiers. De plus nous utiliserons des souris génétiquement modifiées permettant d'identifier les circuits neuronaux répondant aux opiacés, ces modèles n'existent que chez la souris.

"Réduction" : 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. De plus ces études se feront de manière longitudinale, afin de tester plusieurs paramètres (dépression et interaction sociale) chez le même animal afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées.

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 12 souris chacun.

"Raffinement": nous avons choisi d'utiliser des protocoles expérimentaux qui minimisent au maximum l'inconfort des animaux tout en permettant néanmoins d'étudier les réponses comportementales à l'administration d'opiacés ou de ligands de RCPG. 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, les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie (anesthésique profond et un anesthésique local autour du site de chirurgie) et les animaux recevront un traitement antidouleur (traitement par un anti-inflammatoire). La température corporelle de l'animal 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. Pour cela nous utiliserons une grille d'évaluation jusqu'à leur mise à mort incluant des signes d'apparence (inactif, moins actif, ataxique, pelage hirsute, regard morne, animaux blottis, isolé, paupières mi-closes, absence de toilettage) et des signes lors de la manipulation (agressif, réticent à se déplacer, vocalisations, hyperactif, perte de poids corporel).

Ce projet aura de nombreux bénéfices, en particulier d'identifier les neurones critiques dans le développement de la dépendance aux opiacés, et d'identifier de nouvelles cibles moléculaires dans ces neurones. Ceci permettra de caractériser les mécanismes d'adaptation des neurones à l'exposition répétée aux opiacés, afin d'identifier des biomarqueurs de la maladie pour le diagnostic, la prévention et le traitement de la dépendance aux opiacés et de faire face à la forte augmentation de la consommation d'opiacés dans le monde.

17345 Ce projet de recherche vise à identifier de nouveaux mécanismes moléculaires participant à l'activité locomotrice.

Ce projet se concentrera sur des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) orphelins dont les fonctions et les ligands sont inconnus. Les RCPGs orphelins sont des récepteurs qui n'ont pas de ligand

endogène connu et de ce fait leurs fonctions sont encore méconnues. Les RCPGs en général sont des cibles privilégiées pour le développement de médicaments (50% des médicaments disponibles ciblent des RCPGs). Les RCPGs orphelins sont donc intéressants à étudier pour développer de nouveaux médicaments, et ceux qui sont exprimés dans le cerveau sont des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de maladies neuropsychiatriques. GPR88 est un RCPG orphelin enrichi dans des régions permettant le contrôle de la locomotion et de la motivation. De plus, il a été démontré précédemment une forte hyperactivité et des déficits de l'attention chez des animaux génétiquement modifiés n'ayant pas le récepteur GPR88. Ainsi, l'activation de ce récepteur est une piste thérapeutique pour réduire l'hyperactivité, et potentiellement les déficits de l'attention associés (mais ceci sera une étape ultérieure). Nous testerons l'effet d'agonistes GPR88 (activateurs spécifiques du récepteur GPR88) sur l'activité locomotrice, notre hypothèse étant que l'activation de GPR88 réduirait l'activité basale des animaux. Ainsi, les souris n'exprimant plus GPR88 et les souris contrôles seront avec des molécules agissant sélectivement sur GPR88 et les conséquences de ces traitements seront analysés sur la locomotion à l'aide d'un test comportemental classique validé.

L'objectif est donc de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'hyperactivité et potentiellement d'autres troubles neuropsychiatriques. Ce projet nécessitera un maximum de 480 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 pour minimiser au maximum l'inconfort des animaux tout en permettant néanmoins d'étudier les propriétés de nouveaux ligands.

"Remplacer" : les effets comportementaux de nouveaux ligands de RCPGs orphelins ne peuvent pas être étudiés en utilisant des modèles cellulaires, qui par nature ne récapitulent pas la complexité de l'organisation cérébrale en réseaux complexes de structures interconnectées. De plus nous utiliserons des souris génétiquement modifiées sans le récepteur orphelin, ce modèle n'existe que chez la souris. 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 l'activation du récepteur GPR88 seront constitués de 12 souris chacun.

"Raffiner": nous avons choisi d'utiliser des protocoles expérimentaux qui minimisent au maximum l'inconfort des animaux tout en permettant néanmoins d'étudier les réponses comportementales à l'administration de ligands de RCPG. 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. Finalement, Des points limites prédictifs seront établis permettant d'interrompre l'étude limitant ainsi la souffrance, la douleur et le stress pour l'animal.

17346 Le cancer du pancréas avec près de 10000 nouveaux cas par an, est l'un des cancers les plus graves, avec une espérance de survie à 5 ans très faible (inférieure à 5%). A l'heure actuelle, la chirurgie reste le meilleur traitement possible pour les 15 à 20 % de patients dont la tumeur est opérable. Et bien que certains protocoles de chimiothérapie aient permis une amélioration de la durée et de la qualité de vie des patients, le traitement de ce cancer reste un enjeu majeur des recherches en oncologie. Il est maintenant clairement établi que certains types des fibres nerveuses infiltrant les tumeurs influencent la progression tumorale. Les résultats de l'équipe ont montré que le système nerveux périphérique sympathique remodèle et augmente au sein des cancers de type adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC). Nous avons montré que le système nerveux sympathique a un rôle protecteur sur le développement tumoral pancréatique. Ce projet a pour but de mieux comprendre les mécanismes qui entraînent le remodelage du système nerveux sympathique afin d'explorer de nouvelles voies pour lutter contre la progression tumorale. Mais aussi d'étudier le remodelage d'autres composants du système nerveux sympathique qui reste encore mal compris. Les différentes procédures utilisées dans ce projet nous permettront : 1/ de mieux comprendre le rôle au sein des tumeurs des différents type

d'innervation du pancréas, 2/ de caractériser les interactions entre les projections nerveuses et certains composants du microenvironnement. Ces données sont importantes, elles pourraient à terme permettre de contribuer à l'identification d'indicateurs pronostiques pour les patients et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de mettre au point de nouveaux traitements. La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés et de suivre la règle des 3R. Pour nos expériences, les souris issues des croisements développeront ou pas des tumeurs en fonction des combinaisons d'allèles, on utilise les souris ne développant pas de tumeurs comme contrôle ou pour les expériences d'injections de cellules tumorales. Ainsi nous réduisons le nombre de croisements et d'animaux non utilisés. Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, les études *in vitro* ne permettent pas de récapituler l'ensemble des interactions cellulaires existantes lors du développement des tumeurs. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies humaines. En particulier, ils fournissent des modèles de tumeurs pancréatiques qui sont décrits pour récapituler les différentes étapes du développement de la pathologie. Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets afin d'enrichir le milieu de vie, et d'augmenter le bien-être animal. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être (BEA) des animaux sont contrôlés. Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier via une échelle, agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises.

Ce projet utilisera 1170 souris sauvages et 894 souris génétiquement modifiées.

17347 Dans l'évolution humaine, le bol alimentaire s'est fortement réduit sans diminution de l'apport calorique quotidien. L'adaptation à un régime omnivore avec des aliments cuits aurait pu réduire le coût de la digestion, libérant de l'énergie pour le développement de la masse cérébrale ou d'autres fonctions. Une étude préliminaire semble confirmer l'importance de la taille du bolus dans le budget énergétique d'une espèce de primate non-humain omnivore. Néanmoins, l'effet de régimes avec des teneurs en macronutriments et des digestibilités différentes n'a toujours pas été testé, ce que nous proposons d'explorer chez cette même espèce en évaluant le coût de la digestion de régimes isocaloriques différant uniquement dans leur composition (équilibre entre les macronutriments - teneurs en lipides, glucides et protéines) et complexité (présence ou non de fibres, cru vs cuit). L'évaluation des économies réalisées à court-terme par la modification du bolus pourraient préfigurer des mécanismes à long-terme à l'origine de l'augmentation de la taille du cerveau chez l'Homme. Par ailleurs, la flore microbienne intestinale est très réactive au changement de régime alimentaire et affecte, en retour, les performances énergétiques des animaux. Nous faisons l'hypothèse qu'une variation à court terme du microbiote intestinal est associée à la libération d'énergie allouée à la digestion.

Les objectifs de ce projet sont les suivants:

- 1) Evaluer les effets de modifications en composition et complexité du régime alimentaire sur le coût de la digestion.
- 2) Mesurer la digestibilité de chaque régime alimentaire testé.
- 3) Evaluer la réponse microbienne aux différents régimes alimentaires.

Pour cela, des groupes de 8 animaux seront constitués pour évaluer la réponse à court-terme (maximum 3 jours) d'une modification du régime alimentaire (passage de régime CTL à un régime 'Traitement' pour tous les animaux). Cet objectif sera rempli par le passage des animaux dans un dispositif de calorimétrie indirecte, avec évaluation des taux d'activité physique par des capteurs de mouvement infrarouge. Chaque animal passera au maximum 6 jours dans le dispositif : 3 jours d'habituation sous régime CTL, puis passage pendant 3 jours à un régime 'Traitement' attribué au préalable de manière aléatoire. Trois régimes 'Traitement' seront testés et comparés à un régime CTL:

un régime hyperlipidique (60% lipides vs 20% dans le régime CTL), un régime fibreux (7% de fibres ajoutées vs 0% dans le régime CTL) et un régime cuit (mixture de viande et de pain d'épices cuite vs crue pour le régime CTL). Ce dernier traitement sera réalisé chez cette espèce omnivore (régime alimentaire naturel très varié allant des gommes d'arbres aux insectes ; en laboratoire, cette espèce mange tout, même la viande) pour tester l'effet de la cuisson, comme composante majeure de l'évolution de l'alimentation humaine, sur le coût de la digestion. Les animaux seront suivis en continu pour les échanges respiratoires, leur masse corporelle, leur prise alimentaire et leur activité locomotrice. Les fèces seront récupérées chaque jour pendant toute la phase dans les cages de calorimétrie afin d'évaluer la digestibilité des régimes. A la fin des 6 jours, chaque animal sera retiré du dispositif, prélevé en urine et en sang (pour dosages des facteurs endocriniens représentatifs à la fois de la dépense énergétique - hormones thyroïdiennes, cortisol - et de la digestion - hormones intestinales) et en fèces (mesure de la réponse de la flore microbienne intestinale). Les mesures réalisées seront comparées à celles réalisées quelques jours plus tôt sur les mêmes animaux, en situation CTL.

Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux mais assurer tout de même un pouvoir statistique suffisant pour les effets attendus, les procédures expérimentales seront réalisées sur un nombre maximal de 8 animaux adultes par groupe expérimental. Au total, 24 animaux seront donc utilisés pour ce projet. Le but de cette étude étant de caractériser aux plans intégratifs les coûts de la digestion dans un contexte physiologique, une grande attention sera portée au maintien des conditions optimales pour le bien-être des animaux en essayant d'être le moins intrusif possible. Dans cette optique, les procédures de ce projet ont été raffinées puisque l'évaluation du niveau d'activité locomotrice (nécessaire pour le calcul des différentes composantes de la dépense énergétique) n'est plus réalisée par télémétrie (nécessitant la pose d'un implant intra-abdominal avec chirurgie sous anesthésie générale) mais par des capteurs infrarouge placés dans les cages. L'indicateur privilégié pour le suivi du bon rétablissement de l'animal après application des procédures expérimentales sera les variations anormales de masse corporelle. Dans le contexte saisonnier, les variations de poids peuvent aller jusqu'à 10% en une semaine. Une perte de poids sera considérée comme pathologique à partir du moment où ce seuil sera dépassé. Ce critère sera pris en compte avec d'autres critères comme la prostration, l'état de forme général de l'animal (réactivité, agressivité, etc). Enfin, un maximum d'attention sera également apporté à la maîtrise des techniques utilisées afin de limiter au mieux le stress et la douleur chez les animaux expérimentés, qui retourneront dans l'animalerie générale à l'issue du projet.

17348 La douleur est une émotion désagréable mais elle est utile. Elle joue un rôle protecteur pour l'organisme, permettant une adaptation comportementale et cognitive afin de protéger et prévenir tout dommage tissulaire menaçant l'intégrité de l'organisme. Si la douleur dure plus de 3 mois, elle devient « chronique » et perd son utilité physiologique. Peu de traitements sont aujourd'hui satisfaisants en raison des effets secondaires des substances utilisées et de leur faible efficacité dans certains cas.

Ce projet est réparti sur 5 ans et nécessite 320 rats Sprague-Dawley. Il vise à caractériser le codage de l'information « douloureuse » (ou nociceptive) ainsi que sa modulation par les contrôles descendants. Grâce à la disponibilité d'une thermode de stimulation chaud/froid ultra-rapide permettant de chauffer ou refroidir la surface cutanée sur des surfaces réduites (8mm²), nous avons l'opportunité de mieux comprendre comment la réponse nociceptive au chaud/froid est intégrée par la moelle épinière. Nous utiliserons également cet outil pour caractériser l'efficacité des contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs afin d'identifier une possible source de l'expression des hypersensibilités nociceptives dans différents modèles de douleur. Deux modèles distincts seront utilisés : des rats présentant une monoarthrite inflammatoire du genou et une neuropathie par constriction chronique du nerf sciatique (cuff). Dans ces deux modèles, la guérison est spontanée mais les symptômes sont distincts, en particulier vis-à-vis du chaud et du froid : la neuropathie induit une hypersensibilité au froid marquée, tandis que l'inflammation provoque une hypersensibilité au chaud.

Pour tenter de comprendre ces symptômes, observés à l'aide de tests nociceptifs en comportement, nous ferons des enregistrements électrophysiologiques de neurones de la moelle épinière qui codent les informations nociceptives thermiques provenant de la périphérie du corps. Au cours de l'expérience,

nous évaluerons l'efficacité avec laquelle les stimulations nociceptives chaudes et froides sont capables de recruter les contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs. La contribution des grands systèmes de modulation supraspinaux, monoaminergiques, sérotoninergiques, opioïdiques et ocytocinergiques sera également évaluée.

La règle des 3R sera mise en œuvre à travers les procédures suivantes : i) Raffinement par hébergement en cages collectives enrichies (bâton de bois et tunnel) après sevrage et maintien des fratries selon les sexes dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, par une utilisation appropriée des méthodes d'anesthésie et d'analgésie lors des chirurgies et expérimentations et par un suivi post-opératoire permettant de surveiller l'état des animaux à l'aide d'une grille de score et de l'établissement de points limites permettant de soustraire l'animal à la souffrance, ii) Réduction par l'utilisation d'un nombre d'animaux suffisant pour d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques, et iii) Remplacement : le projet portant sur la nociception il est actuellement impossible de se passer de sujets vivants et dotés d'un cortex développé.

17349 La mémoire est une fonction essentielle de la santé mentale puisqu'elle permet de guider de nombreux comportements chez l'animal (recherche de sites de nourriture, exploration du territoire...). La formation d'un souvenir repose sur des modifications synaptiques entre neurones qui doivent être stabilisées et consolidées pour que le souvenir ne s'estompe pas. Cette stabilisation implique l'activation de gènes régulés par des réarrangements génomiques locaux encore mal connus. Notre objectif est de vérifier et caractériser l'implication d'une protéine de l'hippocampe dans ces processus mnésiques en l'invalisant. Une nouvelle technique d'invalidation est désormais disponible : les Nanotaxi qui sont une combinaison d'un bloc copolymère et d'une séquence d'ADN choisie pour invalider ou surexprimer un gène d'intérêt. Les Nanotaxi présentent de nombreux avantages. A la différence d'autres approches (i.e. virus adéno-associé = vecteur de transfert de gènes, lentivirus...), ils sont efficaces dans de nombreux tissus et surtout chez la plupart des vertébrés. Comme ils n'impliquent pas d'agents viraux, ils sont plus faciles d'utilisation et n'ont pas d'effets inflammatoires.

Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 80 cailles femelles adultes.

Notre projet respecte ainsi la règle des 3R :

Remplacement : Ce projet ne peut s'entreprendre que chez l'animal entier dans la mesure où il est impossible de remplacer la complexité des régulations physiologiques observées chez l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Réduction : 80 cailles femelles seront requises ce qui constitue un nombre minimal compte tenu des aléas expérimentaux pour tester statistiquement l'hypothèse.

Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation, de soins. Ils seront manipulés dans le calme, avec douceur. La chirurgie se déroulera sous anesthésie générale et respectera les règles d'asepsie. Des analgésiques appropriés seront administrés. Un anesthésique local sera injecté en sous-cutané sur le site opératoire, un gel ophtalmique sera appliqué sur les yeux et la boîte de réveil sera disposée à proximité d'un dispositif chauffant. Le stress sera limité par le placement des animaux à l'obscurité durant la phase de réveil avant leur réintroduction dans leurs cages d'élevage.

17350 Les troubles de consommations aux opiacés sont en forte augmentations ces dernières années et ont des conséquences dévastatrices. Ce projet de recherche vise à identifier de nouveaux mécanismes moléculaires participant au développement des troubles de l'humeur (en particulier dépression) qui se développent lors de la mise en place d'une dépendance aux opiacés.

Les opiacés agissent sur le « système opioïde » dans le cerveau. En conditions normales, ce système neuromodulateur régule la douleur, les processus de récompense, les réponses émotionnelles et les réponses au stress. L'exposition aux opiacés altère le fonctionnement de ce système, ce qui conduit aux troubles du comportement et de l'humeur. L'objectif de ce projet consiste à comprendre le développement de ces pathologies, en identifiant les régions cérébrales et les populations neuronales spécifiques qui sont impliquées, en utilisant des modèles murins. Pour les animaux, l'exposition

chronique aux opiacés (une semaine) engendrera une perte de poids transitoire qui se normalisera une semaine après l'arrêt du traitement.

Un nombre maximum de 480 souris (*mus musculus*) sera utilisé pour l'ensemble du projet.

Ce projet 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 pour minimiser l'inconfort des animaux tout en permettant d'étudier l'effet de l'exposition aux opiacés sur l'état émotionnel des animaux au long court (4 semaines).

Remplacement : les effets de l'exposition aux opiacés sur le comportement et leurs conséquences au long court ne peuvent pas être étudiés en utilisant des modèles cellulaires, qui par nature ne peuvent récapituler la complexité de l'organisation cérébrale en réseaux neuronaux complexes. L'étude de ces effets nécessite donc l'analyse d'organismes mammifères vivants et entiers. La souris est l'organisme le plus adapté car nous pouvons étudier des comportements liés aux addictions et aux réponses émotionnelles.

Réduction : les animaux utilisés seront consanguins, ce qui permet de diminuer la variabilité entre individus et donc de réduire le nombre d'animaux tout en mettant en évidence un effet statistiquement significatif. De plus ces études se feront de manière longitudinale, afin de tester plusieurs paramètres chez le même animal (dépression et interaction sociale) et donc de réduire au maximum le nombre de souris utilisées.

Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité interindividuelle attendue, les groupes expérimentaux que nous utiliserons seront constitués de 12 souris chacun.

Raffinement: nous avons choisi d'utiliser des protocoles expérimentaux qui minimisent au maximum l'inconfort des animaux tout en permettant néanmoins d'étudier les réponses comportementales à l'administration d'opiacés. De plus, 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 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.

17351 La rate, véritable filtre du sang, protège l'organisme contre des maladies infectieuses. La capacité de réagir contre des pathogènes est régulée par des cellules immunitaires, appelées macrophages. Chez les nouveau nées et chez les personnes âgées ces cellules ne sont pas encore ou moins bien différenciées par rapport à l'âge adulte rendant l'organisme jeune ou âgée plus vulnérable à des infections virales et bactériennes systémiques. Notre recherche porte sur la régulation de ces macrophages et aura alors un impact pour la santé humaine. Nos études permettent de tester des moyens pour renforcer leur présence et de mieux évaluer les conséquences de leur diminution à une infection virale, qui pourrait alors voir des suites graves pour la santé.

Remplacement : La rate est un organe complexe comportant une multitude de cellules immunitaires localisées à des endroits stratégiques pour garantir une réponse immunitaire précise et adaptée aux types d'infection. A l'heure actuelle, une approche alternative aux expériences chez l'animal qui reproduit ces complexités de l'organe n'existe pas.

Raffinement : Les expérimentations sont effectuées sur des souris sous anesthésie générale et par un personnel compétent. Les animaux seront observés quotidiennement. La dose de virus recombinant est faible et ne devrait pas provoquer de fièvre. Néanmoins nous vérifierons le bien être des souris par une grille d'évaluation (voir tableau score). Des points limites prédictifs adaptés à chaque procédure ont été déterminés afin d'interrompre les procédures limitant ainsi la douleur animale à son minimum. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi comprenant des nids et frisure de carton.

Réduction : Nous utiliserons les connaissances rapportées dans la littérature et acquises par les laboratoires, notamment sur les techniques permettant d'activer et de mesurer la réponse immunitaire et la présence des macrophages afin de réduire le nombre de souris. Le nombre total des souris pour

ce projet est de 752 souris. Le nombre d'animaux est le minimum permettant une analyse de nos données par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni.

17352 Chaque année, environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués à travers le monde et sont responsables de plus de 8 millions de décès. En France, 385 000 cas 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 immuns. La génération d'un environnement immunosuppresseur est le point de départ de l'échappement des cellules tumorales à la surveillance immunitaire. Les immunothérapies sont conçues pour restaurer la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales par le propre système immunitaire du patient. Le présent projet s'inscrit dans cette dynamique thérapeutique.

Notre laboratoire développe un anticorps thérapeutique ciblant les récepteurs CD94/NKG2A qui sont à l'origine de l'inhibition des fonctions effectrices (cytotoxiques et production de cytokines) des lymphocytes T CD8 et Natural Killer (NK). En effet, des signaux inhibiteurs sont induits lorsque les récepteurs CD94/NKG2A interagissent avec leurs ligands (HLA-E chez l'homme et Qa-1b chez la souris) surexprimés par de nombreuses tumeurs. La stratégie thérapeutique développée par notre laboratoire réside dans le blocage de ces interactions par un anticorps, afin de réactiver les fonctions de ces cellules immunes, jouant un rôle crucial dans la reconnaissance et le rejet des cellules tumorales.

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 NKG2A 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 et de la SBEA.

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 présent projet consiste à valider l'efficacité anti-tumorale du blocage du récepteur NKG2A. Les systèmes de régulation des cellules NK de l'homme et de la souris étant très proches, la souris représente le modèle animal le plus pertinent. Nous envisageons d'évaluer l'efficacité d'un anticorps reconnaissant les récepteurs NKG2A dans des souris immunocompétentes et immunodéficientes porteuses de tumeurs exprimant Qa-1b. 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 un second temps, l'efficacité anti-tumorale de l'anticorps anti-NKG2A, seul ou en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques (anticorps, chimiothérapies, inhibiteurs de kinase...) sera évalué sur des souris porteuses de tumeurs. Différents modèles de tumeurs seront utilisés : les cellules tumorales seront greffées soit par voie sous-cutanée, soit par voie intraveineuse.

Le nombre total d'animaux est évalué à 11696 sur 5 ans.

17353 Le paludisme est une maladie parasitaire, transmise chez l'Humain en zones d'endémies palustres par la piqûre d'un moustique *Anopheles* infecté. L'agent pathogène est un parasite protozoaire du genre *Plasmodium*. La maladie présente un spectre clinique varié allant de la forme aigüe (paludisme simple) aux formes graves qui peuvent conduire à la mort, comme c'est le cas pour le neuropaludisme. L'infection se traduit par une phase de développement dans le foie qui est asymptomatique ; on parle donc de stade hépatique ; puis d'un stade sanguin issu du relargage des parasites intrahépatocytaires qui infecteront les globules rouges. Le neuropaludisme est une encéphalopathie caractérisée par un recrutement, dans le cerveau, de parasites qui sont séquestrés dans les capillaires cérébraux, de lymphocytes et d'une réponse inflammatoire excessive.

A la lumière de la complexité du cycle de développement de *Plasmodium*, différents composants de la réponse immune opèrent durant les différentes étapes du cycle de la vie du parasite, dans les différents compartiments lymphoïdes de l'hôte infecté, pour contrecarrer l'infection. Certaines de ces réponses immunes sont protectrices, d'autres sont associées aux formes pathologiques graves dont le neuropaludisme.

Ce projet vise à étudier les réponses immunes protectrices ou pathologiques associées au paludisme. En particulier, nous utiliserons le modèle expérimental murin chez la souris C57BL/6 infectée, soit par 1) *Plasmodium* (*P.*) *yoelii* entraînant une infection non létale, les souris guérissant environ 3 semaines après l'inoculation des parasites en intrapéritonéale ou intraveineuse (modèle de protection) ; 2) *P. berghei* ANKA qui induit un syndrome neurologique chez la souris, mimant en partie celui observé chez l'Homme infecté par *Plasmodium falciparum* (maladie létale caractérisant le neuropaludisme) ; et 3) lors d'une co-infection *Toxoplasma gondii* et *P. berghei* ANKA, l'infection chronique de souris C57BL/6 par *T.gondii* étant caractérisée par la présence de kystes latents dans le cerveau, qui protègent du neuropaludisme. Les objectifs spécifiques du projet sont : 1) Identifier les réponses immunes, 2) Analyser leurs propriétés fonctionnelles, 3) Etudier leurs mécanismes d'induction, de maintenance, et de régulation, et 4) Les facteurs génétiques contrôlant l'établissement de ces réponses. Des explorations seront effectuées au niveau cellulaire (en imagerie photonique et confocale, cytométrie de flux, imagerie du petit animal vivant), et par des approches moléculaires (transcriptomique et protéomique).

Pour se faire, nous projetons l'utilisation de 2200 souris, tout génotype confondu, pour mener à bien ces études dans leur intégralité, sur une étendue de 5 ans. Ces expérimentations sont construites autour du principe de respect des règles de remplacement, réduction et de raffinement, en alliant l'obtention de résultats fiables et le bien-être des animaux. Les expérimentations seront optimisées afin qu'elles soient utilisées à leur maximum, complétant plusieurs études de notre projet et dans le but de réduire au mieux le nombre d'animaux utilisées. Aussi, elles seront complétées par des outils alternatifs à l'utilisation du modèle animal. Néanmoins, il est à noter que les modèles utilisés sont indispensables au projet, nécessitant l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, mais aussi, pour le moment, non remplaçable, les études sur l'Homme étant très difficiles. Les conditions d'hébergement des souris sont conformes à la réglementation et en accord avec le personnel de l'animalerie. Par ailleurs, une surveillance des animaux sera réalisée toutes les demi-journées dès le début de l'infection, afin de collecter les points limites de manière stricte et de réduire et mettre fin aux stress et souffrances de l'animal, dès le début de l'apparition des symptômes du neuropaludisme. Finalement, le personnel, qui réalisera ses expérimentations, est formé à l'expérimentation animal, à l'éthique associée, maîtrise complètement chaque procédure, déjà mise en place au sein de notre laboratoire, et réalise une veille scientifique régulière.

17354 Chez l'Homme, des mutations du gène *CRB1* ont été associées à des formes variables, plus ou moins sévères, de maladie de la rétine. Le degré de sévérité des maladies de la rétine associées à *CRB1* a pu être en partie expliquée par des effets modificateurs exercés par d'autres gènes ayant aussi une fonction dans la rétine. En effet, il a été mis en évidence, sur une portion du chromosome 15 de la souris, l'existence d'un tel gène sans pouvoir identifier précisément ce gène. Cette portion de

chromosome contient le gène Vps13b, dont les mutations causent aussi une maladie de la rétine. Il se pourrait donc qu'une mutation dans le gène VPS13B rendent plus sévère la maladie associée à CRB1 et vis-versa : une mutation dans CRB1 rende plus sévère la maladie associée à VPS13B. Nous souhaitons donc par le présent projet déterminer, chez la souris, si des variations du gène Crb1 influent sur l'expression de la maladie de la rétine associée à la délétion du gène Vps13b, et vis-versa. In fine, il pourrait permettre un meilleur diagnostic et une meilleure prise en charge des patients atteints de maladie de la rétine qui sont encore en errance diagnostique à l'heure actuelle.

Nous réaliserons cette étude en croisant la lignée de souris ayant subi une délétion du gène Vps13b (Vps13b^{-/-}) avec la lignée de souris C57Bl6/N qui porte la mutation dite rd8 sur le gène CRB1 (Crb1^{rd8/rd8}) et suivrons l'évolution de la structure et de la fonction des rétines des souris issues de ce croisement au cours de leur vie jusqu'à un maximum de 12 mois. Ce suivi sera réalisé grâce à deux techniques d'ophtalmologie usuellement appliquées à l'Homme. Nous effectuerons des fonds d'œil par ophtalmoscopie pour évaluer la structure de la rétine et nous suivrons la perte de fonction des cellules rétinienne par des mesures électrophysiologiques sous anesthésie. Les données obtenues seront comparées à celles des souris Vps13b^{-/-} et des souris Crb1^{rd8/rd8} afin d'identifier de potentiels effets modificateurs et digéniques sur la sévérité des défauts rétiens et leurs âges d'apparitions.

La conformité à la règle des 3R a été scrupuleusement respectée de la manière suivante. Dans un souci de remplacement, nous effectuerons sur la souris uniquement les tests qui nécessitent un organisme vivant. En effet, nous avons déjà mis en place des études *in vitro* sur des cellules d'épithélium pigmentaire de rétine et des cellules de patients. Cependant, la rétine est un tissu complexe dont l'activité est régie par de multiples interactions entre différents types cellulaires. Le maintien et l'étude d'une rétine dans des conditions *in vitro* restent à l'heure actuelle encore impossibles. Ainsi, on ne peut se passer du recours aux animaux pour notre étude. L'utilisation de la souris se justifie par sa capacité à développer rapidement (en moins d'un an), une maladie de la rétine comparable à celle de l'Homme en ce qui concerne les mutations des gènes CRB1 et VPS13B. La totalité de ce projet utilisera 108 souris sur une durée de 2 ans. Dans un souci de réduction, les mêmes animaux seront utilisés pour l'ensemble des analyses (ophtalmoscopie et électrorétinographie). Afin d'utiliser le minimum d'animaux possible nous effectuerons des tests statistiques non-paramétriques lors de nos analyses de résultats. Aussi, notre laboratoire possède actuellement cinq personnes travaillant sur le syndrome de Cohen ; nous avons donc mis en place une banque d'organes où nous plaçons en fin de procédure l'ensemble des organes impliqués dans le syndrome de Cohen afin qu'ils soient disponibles pour l'ensemble de l'équipe dans d'autres projets. Dans un but de raffinement, nous avons combiné un protocole d'électrorétinographie et d'ophtalmoscopie sous une même anesthésie afin d'éviter un trop grand nombre de manipulation et d'injection et ainsi éviter un stress et une souffrance supplémentaire aux animaux étudiés. De plus, si lors d'une analyse nous observons une cécité bilatérale alors nous mettrons fin au protocole expérimental. Il est prévu de faire une analyse rétrospective des souris de chaque génotype Vps13b/Crb1 au bout de 6 mois afin de pouvoir déterminer précisément le degré de sévérité de leur phénotype qui est pour l'instant estimé « modéré » du fait de la cécité qui est supposée les affecter après plusieurs mois de vie sans toutefois s'accompagner de douleurs. Ainsi, des grilles de scores seront remplies afin de mesurer la souffrance des animaux. Puisqu'une fois la cécité détectée les animaux aveugles seront mis à mort, nous n'avons pas classé la procédure expérimentale comme « sévère ». De plus, l'ensemble de la procédure expérimentale serait de classe « légère » si elle était effectuée sur des souris saines car l'ensemble des techniques utilisées se fait en routine dans le cadre du suivi d'une pathologie oculaire chez l'Homme.

17355 Malgré les avancées significatives réalisées ces dernières années dans le traitement des cancers, beaucoup de patients ne répondent pas aux traitements disponibles. Des développements de nouvelles stratégies sont nécessaires.

La restauration d'une immunité efficace contre les cellules tumorales est une stratégie prometteuse. Notre laboratoire a mis au point et breveté une nouvelle stratégie de vaccination très prometteuse, applicable à un grand nombre de cancers mais aussi aux infections virales et en médecine vétérinaire. Cette technologie est basée sur une plateforme pseudo-virale sur laquelle sont greffés des antigènes

tumoraux ou viraux, et constitue un outil thérapeutique puissant pour activer le système immunitaire contre les cellules tumorales ou les virus pathogènes. Des analyses *in vitro* ont permis de montrer l'efficacité de cette stratégie à stimuler des réponses immunitaires effectrices dirigées contre les antigènes présents sur les particules, et des études *in vivo* avec des particules de grade « recherche » ont permis de démontrer que la vaccination de souris avec un tel complexe induit l'activation de réponses immunitaires dirigées contre les antigènes présents sur la particule, ainsi qu'à l'inhibition complète de la croissance d'une tumeur exprimant les antigènes d'intérêt.

En vue du transfert clinique de cette stratégie, des particules compatibles avec leur utilisation chez l'homme ont été développées. Le but de notre étude est de tester *in vivo* l'immunogénicité et l'efficacité anti-tumorale de ces nouvelles particules, étape indispensable avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme. Pour cela, des souris C57Bl6 seront vaccinées avec les particules portant l'antigène d'intérêt ovalbumine (noté long OVA), et nous étudierons leur capacité à induire des réponses T et B spécifiques, et leur efficacité à inhiber le développement d'une tumeur exprimant l'antigène d'intérêt en conditions prophylactiques et thérapeutiques. De plus l'effet des particules sur des tumeurs n'exprimant pas l'antigène d'intérêt ainsi que l'impact de particules contrôle est nécessaire pour s'assurer de la spécificité d'action des particules. L'impact des particules contrôle sera évalué lors d'une expérience menée en parallèle nous n'avons donc pas besoin de les comptabiliser dans le protocole ci-dessous.

Nous aurons ainsi 2 groupes d'animaux. Pour chaque groupe, 10 souris seront nécessaires. La vaccination sera réalisée en conditions prophylactiques et thérapeutiques, ce qui fait un total de 40 animaux.

Tout sera mis en oeuvre pour respecter la démarche éthique des 3R:

Remplacement: l'étude de la réponse à la vaccination et son impact sur le développement tumoral ne peut s'effectuer que *in vivo*; ce processus met en jeu différents types cellulaires qui interagissent de façon complexe, ce qui n'est pas modélisable *in vitro*; le remplacement du modèle animal pour cette étude n'est pas envisageable.

Réduction: les particules vaccinales ont été optimisées et sélectionnées par des tests *in vitro* afin de réduire les lots d'animaux nécessaires; nous avons réduit les nombres d'animaux/lot au minimum afin d'obtenir des résultats interprétables sur la base des besoins imposés par les tests statistiques. Par ailleurs, l'utilisation des groupes contrôle d'une autre expérience qui sera menée en parallèle de celle présentée ici permet de diminuer de moitié le nombre d'animaux utilisés.

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, ce qui permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe d'inconfort ou de souffrance. La tumeur sera implantée par voie sous-cutanée dans le flanc, ce qui n'entraîne que très peu d'inconfort.

17356 Le cancer de la prostate (CP) est le cancer le plus fréquent chez l'homme. Il représente la deuxième cause de mortalité par cancer en France. Parmi les différentes approches thérapeutiques possibles, l'hormonothérapie demeure la seule thérapie efficace dans plus de 80% des cas. Toutefois, malgré son efficacité transitoire, l'hormonothérapie n'empêche pas la progression androgène-indépendante (AI) de la maladie qui survient ordinairement dans les 2 à 3 ans suivant l'introduction du traitement hormonal. Le CP devient alors résistant aux traitements et les chimiothérapies de seconde ligne ne permettent que 12 à 18 mois de survie. L'absence de traitements efficaces pour les CP conduit à un réel besoin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Récemment, l'équipe a mis en évidence plusieurs protéines responsables de la résistance aux traitements et le ciblage de ces gènes permet de restaurer la sensibilité aux traitements. Nous avons développé au laboratoire des oligonucléotides antisens (ASO) troisième génération qui ont la particularité de pénétrer dans les cellules afin d'inhiber la protéine ciblée. Dans ce contexte, notre laboratoire réalise des tests chez la souris afin d'évaluer l'efficacité de nos ASO troisième génération. Pour cela, les modèles que nous utilisons sont basés sur la transplantation de cellules tumorales de CP humaines résistantes aux traitements à des souris immunodéficientes. Ces cellules sont à même de « mimer » la maladie observée en clinique et de prédire la réponse thérapeutique. Il n'existe à l'heure

actuelle, aucune autre méthode satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale durant cette étape préclinique.

Nous nous appuyerons sur la règle des 3R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux dans le cadre de ce projet.

Remplacer : Afin de vérifier la pertinence des ASO développés dans le laboratoire, L'efficacité de chaque composé sera validée au préalable sur des modèles de culture *in vitro* avant de démarrer leur évaluation dans les études *in vivo* du présent projet.

Réduction : Pour chacun des composés, nous nous limiterons au nombre minimum d'animaux permettant de caractériser leur efficacité sur les modèles de xénogreffes de cellules tumorales de CP.

Nos approches pour évaluer l'efficacité de chaque composé étudié comprendront des groupes contrôles. Afin de réduire à son minimum le nombre d'animaux et dès que cela sera possible, ces groupes contrôles seront communs à plusieurs tests d'efficacité.

Raffiner : Nos études *in vivo* seront réalisées de manière séquentielle pour déterminer l'action des drogues sur le développement tumoral. Des études pilotes seront menées sur un petit nombre d'animaux (maximum 12) afin de s'assurer de leur bonne tolérance aux molécules et d'adapter les doses à administrer à notre souche de souris.

De plus, le suivi du développement tumoral se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés non invasifs. Enfin, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactes et/ou coton) et par leur maintien en groupes de 4 à 5 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Pour limiter au maximum la souffrance des animaux et selon les besoins de l'étude, les manipulations pourront être effectuées sous anesthésie, et une analgésie sera mise en place si nécessaire.

Pour ce projet qui s'inscrit dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques dans le traitement du CP, nous allons gérer 4 études de ce type par an pendant 5 ans, le nombre maximal d'animaux utilisés au cours de cette période sera donc de 1530 souris.

17357 Le projet concerne les aspects écotoxicologiques de l'exposition orale aux sels de métaux lourds (ML), en ciblant particulièrement le rôle central de la flore dans le maintien de l'homéostasie intestinale et surtout la prévention de l'accumulation de ces métaux toxiques dans l'organisme et les différents organes cibles (sang total, foie, rate, reins).

Les métaux lourds tels le cadmium, le plomb, l'aluminium et l'arsenic (métalloïde) sont des polluants environnementaux préoccupants pour la santé humaine et animale. Ils sont présents dans de nombreux aliments (céréales, légumes, viandes, poissons et crustacés). L'ingestion orale et l'inhalation de ces contaminants, même à l'état de traces, a des effets cumulatifs avec le temps.

Nous envisageons de caractériser chez la souris l'influence d'une exposition orale et chronique à de très faibles doses de sels de métaux : plomb (II), cadmium (II), aluminium et arsenic, distinctement mais aussi en cocktail(s), ces métaux coexistant généralement dans l'environnement). La contribution du microbiote intestinal en transit dans la dissémination de ces composés toxiques au sein de l'organisme sera également abordée par l'utilisation de microorganismes alimentaires ou encore de produits laitiers fermentés.

Le but est de proposer une approche préventive et thérapeutique pour contrer les effets délétères de ces contaminants métalliques, basée sur la manipulation du microbiote intestinal. En effet, l'utilisation de microorganismes alimentaires (bactéries lactiques et levures naturelles préalablement sélectionnées *in vitro*) ou issus du microbiote intestinal peut limiter la biodisponibilité des métaux au niveau du tractus digestif (bioremédiation et par voie de conséquence, l'accumulation dans les organes (action probiotique « détoxifiante »). Le recours à cette stratégie biothérapeutique est d'un intérêt majeur pour traiter la toxicité directe et indirecte des métaux lourds et envisager des bénéfices cliniques et économiques évidents.

Les faibles doses et durées de xénobiotiques utilisées n'induisent aucune douleur et modélisent avant tout les interventions nutritionnelles associées aux conditions de disséminations et d'excrétions. Tout mis en œuvre pour respecter la règle des 3R, remplacer, réduire et raffiner les expériences. Le

"remplacement" par des espèces animales de rang inférieur ou des invertébrées n'est pas envisageable à ce stade de la preuve de concept préclinique.

La "réduction" du nombre d'animaux utilisés a été considérée au maximum, sur la base d'études antérieures par groupe avec une dispersion acceptable des valeurs individuelles.

Le "raffinement" permettant de minimiser la douleur et la détresse, et d'améliorer le bien-être des animaux est bien pris en compte de la réception à la mort des animaux. Ce protocole comprend 3 procédures de classe légère.

Aux vues des procédures expérimentales, sur la base de l'évaluation de 4 métaux distincts et d'un mélange, déclinés en 2 doses et 2 durées (aigue et sub-chronique), pour des groupes de n=8 pour les animaux contaminés et n=5 pour les groupes contrôles, en considérant la duplication des expériences, l'étude « au long court » répartie sur 5 années par an pour évaluer et valider 7 candidats thérapeutiques par métal porte sur une estimation maximale de 1 820 souris (BALB/C).

17358 Les Glioblastomes (GBM) sont des tumeurs cérébrales de très mauvais pronostic. Le traitement de référence repose actuellement sur l'exérèse la plus complète associée à un traitement par radiochimiothérapie. Cependant, malgré ce traitement, la médiane de survie est d'environ 15 mois. Il est donc indispensable de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et de rechercher des paramètres indiquant une résistance au traitement afin d'éviter ou au minimum de retarder la réévolution tumorale qui est souvent fatale. Les modèles murins permettent, par injections orthotopiques de primocultures, de tester de nouvelles thérapeutiques mais ce modèle possède des biais intrinsèques non modifiables. C'est pourquoi il est capital de trouver un modèle pré-thérapeutique plus proche des conditions humaines. Depuis plusieurs années, des cultures cellulaires en 3 dimensions se développent et permettent de recréer étapes par étapes des conditions expérimentales proches de ces conditions humaines. Notre équipe a mis au point un modèle de culture en 3 dimensions permettant de cultiver des cultures primaires de GBM associées à une partie du microenvironnement tumoral. L'objectif du projet est double : mettre en évidence des cellules sanguines circulantes permettant de rechercher des indices de résistance en cours de traitement et comparer les modèles de cultures *in vitro* 3D et les modèles murins, dans le but de démontrer la supériorité du modèle 3D *in vitro* ou du moins sa non infériorité, afin de pouvoir s'affranchir à terme des modèles murins (règles des « 3R »). Nous pensons que nos modèles de cultures cellulaires en 3D sont de meilleurs modèles précliniques que les modèles murins. Afin de le démontrer il nous faut comparer ces deux modèles pour à terme de plus utiliser les modèles murins (objectif : remplacement total des modèles murins de glioblastomes). Cette comparaison se fera en comparant l'évolution naturelle *in vivo* et *in vitro* des cellules lignées cellulaires de glioblastomes ainsi que de primocultures de glioblastomes. Puis de comparer l'évolution des primocultures *in vivo* et *in vitro* avec et sans traitement. Dans ce but 360 souris immunodéficientes NOD-SCID-IL-2Rg adultes seront étudiées.

La première étape du projet consistera à injecter en intracrânien des lignées cellulaires de glioblastomes immunomarquées (U251) et de rechercher des cellules tumorales circulantes de GBM dans le sang au fur et à mesure du développement des tumeurs. Les tumeurs seront analysées et comparées au modèle de culture *in vitro* de ces mêmes cellules.

La deuxième étape consistera en l'injection en intracrânien de cultures primaires de GBM et en parallèle à la culture *in vitro* dans nos modèles 3D de ces mêmes primocultures. Il sera réalisé lors de l'euthanasie des souris, une analyse des cellules tumorales circulantes dans le modèle murin selon le protocole validé lors de la première étape. Au bout de 5 semaines, le développement dans les deux modèles sera comparé, afin de démontrer l'égalité des modèles ou la supériorité d'un des modèles.

Troisième étape : répétition du protocole de l'étape 2 et en y associant le traitement standard actuel par radiochimiothérapie dans les deux modèles. Il sera ensuite réalisé lors de l'euthanasie des souris, une analyse des cellules tumorales circulantes sur les modèles murins selon le protocole validé de la première étape et la recherche de variations en fonction du traitement. Au bout de 5 semaines, le développement des tumeurs sera comparé au développement dans les modèles de culture 3D afin de démontrer l'égalité des modèles ou la supériorité d'un des modèles.

Dans le souci du raffinement de nos expérimentations, nous procéderons aux 3 étapes de façon successive. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer les procédures expérimentales et de gérer au mieux les douleurs induites par les différentes manipulations, les différentes étapes seront réalisées successivement, afin de définir à chaque fois les meilleures conditions expérimentales. En effet, l'étape 1 est la plus simple et sera effectuée en premier afin d'optimiser sa réalisation pour les étapes suivantes. Il en est de même pour l'étape 2 qui sera effectuée avant l'étape 3 afin d'optimiser sa réalisation pour l'étape 3. Comme expliqué, les étapes se suivent dans le temps afin d'améliorer à chaque fois les expérimentations.

Par ailleurs, lors des différentes expérimentations, certaines procédures nécessiteront une anesthésie générale associée à de l'analgésie. L'analgésie sera adaptée en fonction du type de manipulation (analgésie orale et sous-cutanée standardisée lors des injections puis adaptée en fonction des signes de souffrance (selon les signes cliniques de surveillance après manipulations et de surveillance quotidienne) et anesthésie générale).

Les souris seront hébergées dans des cages disposées sur portants ventilés avec enrichissement, au nombre de 5 par cage.

REPLACEMENT : L'objectif à terme est de prouver que notre modèle *in vitro* est égal ou supérieur au modèle souris afin d'arrêter d'utiliser les modèles souris.

RÉDUCTION : Nous avons déterminé le nombre minimal de souris suffisant pour conclure pour chaque étape. De plus, afin d'optimiser les expérimentations sur les souris et donc de limiter le nombre nécessaire, nous procédons successivement aux différentes étapes. Chaque étape est un complément de la précédente.

Nous utiliserons des lots de 10 souris et nous analyserons les résultats par tests statistiques de comparaison : test de Wilcoxon ou Mann-Whitney. D'un point de vue statistique, l'utilisation de plus d'animaux par lot semble préférable, nous sommes éthiquement amenés à tenter de réduire le nombre d'animaux utilisés.

17359 L'occurrence des mammites dans les élevages représente un problème majeur en santé animale. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'immunité mammaire est nécessaire pour améliorer la santé et le bien-être des animaux d'élevage, ainsi que la qualité (nutritionnelle, microbiologique...) des produits d'origine animale, tout en réduisant le recours aux antibiotiques. Ce projet s'intéresse au rôle d'une protéine importante dans le développement de la glande mammaire, la protéine SOCS-2 ainsi qu'à la réponse immunitaire. Une mutation ponctuelle de cette protéine, qui invalide sa fonction, a été identifiée comme prédisposant les brebis, sélectionnées pour leur forte production de lait, aux infections. Nous disposons d'un modèle murin qui permet d'étudier les conséquences de cette mutation sur le développement de la glande mammaire au niveau cellulaire. Pour ce faire des biopsies ou des cellules mammaires issues de femelles portant la mutation (KI) et de femelles qui ne portent pas la mutation (WT) seront transplantées dans les glandes mammaires de souris immunodéficientes (Nude, ne rejetant pas le greffon). Pour étudier le fonctionnement de la glande mammaire lors d'infections, nous aurons recours à des modèles d'étude de l'inflammation et de l'infection provoquées soit par un agent bactérien purifié (Lipopolysaccharide), soit par une souche bactérienne (*Staphylococcus aureus*). Ces agents seront administrés soit par injection intrapéritonéale, pour étudier la réaction au niveau global, soit par injection intramammaire pour étudier la réaction au niveau local. Les expériences seront faites au 7ème jour de lactation sur des femelles portant la mutation et des femelles ne la portant pas. Le sang, le lait et les glandes mammaires seront prélevés à 0, 24, 72, 120 heures après injection.

Ces expériences ne peuvent être réalisées qu'à l'échelle de l'organisme avec des animaux vivants. En effet, elles ne peuvent être reproduites *in vitro* puisqu'elles impliquent des interactions entre les différents acteurs des systèmes immunitaire et reproducteur de l'organisme.

Les différentes étapes du protocole seront optimisées pour veiller au respect du bien-être animal et ainsi participer au raffinement de la procédure. Lors des opérations, les animaux seront anesthésiés après avoir reçu un antalgique agissant pendant et après l'opération. Après l'opération, les animaux seront surveillés et si certains présentent des signes de douleur, de léthargie, de refus d'allaitement,

ils seront exclus du protocole et euthanasiés. Ce projet prévoit l'utilisation au maximum de 306 femelles KI, 306 femelles WT, 180 femelles Nude (total : 792 femelles). La réduction du nombre d'animaux sera assurée par la réalisation des transplantations dans deux glandes mammaires par femelle. Tous les animaux utilisés pour ce projet proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Dans un souci de raffinement les souris seront hébergées à plusieurs par cage, puis isolées seulement pour les expérimentations. Chaque cage bénéficie d'un enrichissement adapté (igloo, tunnel ou sopalin). Un nombre minimum d'animaux a été inclus dans l'étude pour générer un nombre de données suffisantes pour réaliser les analyses statistiques.

17360 Le cancer pulmonaire est la première cause de mortalité par cancer en France et dans le monde. Les anticorps qui stimulent la réponse immunitaire anti-tumorale ont apporté un nouvel espoir mais le pronostic du cancer pulmonaire reste sombre. Une des limites de l'activité thérapeutique des anticorps pourrait être due à leur voie d'administration. En effet, les anticorps anti-cancéreux sont administrés exclusivement par voie intraveineuse qui ne permet pas de concentrer l'anticorps dans le territoire pulmonaire. Par le passé, nous avons démontré qu'il était possible d'administrer des anticorps par voie pulmonaire et que cela s'associait à une réduction significative de la charge tumorale dans un modèle murin de métastases pulmonaires. Cette réponse peut être liée à un avantage de la dose atteinte dans le poumon ou d'une action différente de l'anticorps sur le système immunitaire pulmonaire, permettant de mettre en jeu des cellules immunitaires de l'environnement pulmonaire ou une amplitude de réponse différente. Il apparaît donc important de mieux comprendre le mode d'action pharmacodynamie des anticorps administrés par voie pulmonaire, au travers de leurs interactions avec le système immunitaire du poumon pour pouvoir améliorer les traitements anti-cancéreux.

Dans le cadre de ce projet, nous nous attacherons donc à comparer les réponses cellulaires et moléculaires associées à l'administration d'anticorps anti-cancéreux administrés par voie pulmonaire et par voie intraveineuse puis de tester des combinaisons pouvant potentialiser l'effet des anticorps inhalés. Pour réaliser ce travail, nous utiliserons deux modèles murins de cancer bronchique non à petites cellules, sous-type de cancer bronchique le plus fréquent : des modèles orthotopiques de cancer pulmonaire primitif reposant sur la greffe pulmonaire de cellules murines pulmonaires de carcinome de Lewis (2-LLC) et d'adénocarcinome (CMT-167).

Le projet fait intervenir 5 procédures et un total de 4100 animaux sur 5 ans.

Afin de respecter la Règle des 3R :

Raffiner : les souris seront élevées en communauté dans des cages comprenant des éléments d'enrichissement (sous la forme de papier et de fragments de boîtes à œuf). L'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter la souffrance des animaux (anesthésie, prise en compte des signes de souffrance, point limite).

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse thérapeutique et immunitaire d'un organisme entier, face à un cancer pulmonaire et sont insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins de cancers bronchiques chez la souris immunocompétente sont bien décrits et permettent de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

Réduire : nous avons déjà effectué des travaux sur le cancer pulmonaire et l'administration pulmonaire d'anticorps anti-cancéreux, ce qui permettra 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 le modèle le plus adapté pour ces études précliniques car nous pouvons étudier la mécanistique des réponses immunitaires mucosales et systémiques induites par les Ac délivrés par voie pulmonaire en comparant à une administration par voie intraveineuse.

17361 La résistance aux antibiotiques est un problème de santé majeur, qui cause à l'heure actuelle 700 000 décès par an. Ce chiffre pourrait atteindre 10 millions par an d'ici 2050 si aucune mesure alternative n'est mise en place de manière urgente.

La combinaison d'antibiotiques et de peptides antimicrobiens permet de réduire le développement de cette résistance. Il a été montré récemment qu'un peptide antimicrobien produit par la peau, jouait un

rôle essentiel contre les infections cutanées dues à des streptocoques de groupe A (SGA) en favorisant le recrutement des neutrophiles et en empêchant ainsi la dissémination bactérienne. D'autre part, ce peptide est très résistant aux protéases bactériennes ce qui rend son utilisation prometteuse en tant qu'agent thérapeutique.

Nous souhaitons dans ce protocole élargir son utilisation aux MRSA, staphylocoques résistant à la méthicilline. Les MRSA sont responsables de 10 fois plus d'infections que tous les pathogènes gram-négatifs multirésistants réunis.

Nous testerons l'action thérapeutique de ce nouvel agent sur le modèle d'infection sous-cutanée provoquée par des MRSA. Cet effet sera comparé au ceftriaxone, contre lequel ces bactéries développent des résistances (procédure 1) L'effet de l'agent sera testé seul ou en adjuvant à la vancomycine, antibiotique de choix pour le traitement des MRSA (procédure 2).

Pour respecter le principe des 3R, nous allons :

1) Remplacer : Des expériences *in vitro* seront réalisées dès que possible. Toutefois, les modèles animaux sont utilisés ici dans le but d'obtenir des modèles pathologiques d'infection, proches de ceux développés chez l'homme et fournir la preuve expérimentale de l'efficacité du traitement. Au cours de l'infection de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées, telles que les neutrophiles ou les cellules épithéliales et leurs interactions ont un rôle fondamental dans le développement de la maladie. De plus, l'infection est caractérisée par le déclenchement de symptômes, uniquement observables chez l'animal. Il est donc impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des seules études *in vitro*. L'expérimentation animale est donc un élément clé de ce projet.

2) Réduire : Pour ce projet, nous utiliserons 300 souris mâles adultes sur 5 ans. Un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais sera toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions.

3) Raffiner : Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées. Les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de maisonnettes. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale.

Ce projet permettra à terme de proposer cet agent comme alternative thérapeutique dans le traitement d'infections résistantes aux antibiotiques.

17362 La borréliose de Lyme est une zoonose bactérienne transmise à l'homme par piqûre de tiques du genre *Ixodes* et en particulier *Ixodes ricinus*. Le réservoir naturel de la bactérie est représenté principalement par les petits rongeurs et les oiseaux. Les grands mammifères sur lesquels les tiques prennent leur repas sanguin permettent le maintien des populations de tique dans l'environnement. Les agents responsables de cette infection sont des bactéries du genre *Borrelia*, regroupant vingt espèces à ce jour dont les plus répandues sont *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii*. Les agents responsables de cette infection sont transmis à l'hôte au cours du repas sanguin de la tique qui est strictement hématophage. L'incidence de la maladie de Lyme en France a été estimée aux environs de 60 000 cas chaque année. Prévenir la maladie c'est d'abord améliorer sa connaissance et ainsi éviter non seulement les infections mais aussi éviter les complications tardives en cas de non diagnostic de la maladie.

L'analyse de la transmission de cette maladie nécessite l'utilisation de tiques non infectées et infectées aux trois stades, larves, nymphes et adultes mâles et femelles.

Pour mener à bien les différents projets, le laboratoire dispose d'une colonie de tiques (*Ixodes ricinus*) indemne de toute infection par *Borrelia*. Cette colonie permet de développer une seconde colonie de tiques infectée par différentes espèces de *Borrelia*. Pour assurer la survie de la colonie de tique, il faut que les tiques se gorgent sur animal vivant (souris et lapin au laboratoire). Cet aspect constitue le projet de recherche principal et implique le maintien de cet élevage de tiques (*Ixodes ricinus*) au laboratoire.

Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3Rs:

Remplacement : le remplacement des animaux de laboratoire est possible mais compliqué. Il a été mis au point une technique de gorgement des tiques sur membranes, mais ces membranes sont issues d'animaux (gerbilles notamment). Ces membranes doivent être changées tous les jours au cours du repas sanguin afin d'éviter les contaminations bactériennes.

Cette technique n'est donc pas utilisée.

Raffinement : Les souris sont maintenues en groupe jusqu'à leur utilisation. Elles sont gardées en cage individuelle où elles sont surveillées plusieurs fois par jour, ce qui permet d'observer leur état général et aussi de récupérer les tiques déjà gorgées. Les animaux sont nourris ad libitum à toutes les étapes de leur vie.

Les lapins sont hébergés dans des cages individuelles où ils restent en contact olfactif avec leurs congénères donc lorsque l'on dépose des tiques sur eux leur hébergement ne change pas.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés pour le maintien de l'élevage de tiques est minimisé au mieux. Nous utiliserons environ 150 souris (C3H/HeN) et 10 lapins New-Zealand pendant la durée de ce protocole. Afin de minimiser l'utilisation des lapins, ils seront utilisés 3 fois.

17363 Les injections de fer sont souvent très réalisées chez les jeunes animaux de rente (ovins, porcins, caprins, bovins) dans le cadre de la prévention et du traitement de l'anémie ferriprive après la naissance.

Dans le cadre d'une demande d'Autorisation de Mise sur le Marché en Chine d'un produit vétérinaire injectable composé de fer, les autorités chinoises demandent la réalisation du test d'absorption du fer au point d'injection, décrit dans la Pharmacopée Chinoise.

Ce test fait partie des tests de contrôle qualité réalisés lors de la libération de lots de produit contenant du fer en chine. Il permet de valider la qualité du lot en analysant l'absorption du fer après une injection unique et de s'assurer que la quantité de fer non absorbé au niveau du point d'injection ne dépasse pas 20% de la quantité injectée.

Le but de cette vérification est de s'assurer que chaque lot commercialisé est conforme, et que le produit est sûr, tant pour la santé de l'animale que pour la consommation humaine.

Les buts de ce projet sont :

- La réalisation du test d'absorption du fer au point d'injection demandé par les autorités chinoises dans le cadre de la demande d'AMM
- Démontrer que les contrôles physico-chimiques réalisés en France sont suffisants afin de pouvoir s'affranchir de l'utilisation de lapin lors de la libération de chaque lot de produit commercialisé sur le marché chinois

Le test d'absorption du fer au point d'injection va être réalisé pour 3 lots de 3 produits différents ayant une concentration en fer différente.

Pour chaque lot test, 2 lapins seront utilisés. Ils recevront une injection unique dans le muscle vaste médial de l'un des membres postérieurs, l'autre servant de contrôle non injecté. Une semaine plus tard, les lapins seront euthanasiés et la couleur du muscle au point d'injection sera analysée. Des prélèvements du muscle seront réalisés afin de doser la quantité de fer restant au point d'injection.

Cette procédure expérimentale *in vivo* est demandé par la réglementation chinoise. L'un des buts de cette étude est de démontrer que les contrôles qualité réalisés en France sont suffisant pour permettre à terme de s'affranchir de l'utilisation d'animaux pour chaque nouvelle libération de lot. Afin de démontrer ceci, l'utilisation d'animaux dans le cadre de cette étude est nécessaire et ne peut être remplacée par des méthodes n'impliquant pas l'utilisation d'animaux.

La conception de ce projet (sélection des espèces d'essai, statut physiologique, nombre, poids, doses sélectionnées et voies d'administrations) est basée sur la ligne directrice de la Pharmacopée Chinoise en vigueur.

Le nombre d'animaux défini dans la Pharmacopée Chinoise est de 2 lapins par lots commercialisés sur le marché chinois. Dans le cadre de cette étude, plusieurs lots seront testés, soit 40 lapins au total.

L'établissement au sein duquel les animaux sont hébergés fournit des conditions de maintenance adaptées. Les animaux sont hébergés individuellement et bénéficient d'enrichissement pour leur bien-être (ambiance musicale, plateforme, repose patte). La réglementation en vigueur relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques est respectée.

Ce protocole entraîne une douleur faible, une seule injection intramusculaire étant réalisée. Le produit bénéficiant déjà d'une AMM, il a été testé pour ses propriétés pharmacologique et de toxicité, et n'entraîne pas de douleur après injection.

17364 L'incapacité de ralentir la progression de maladies neurodégénératives presse au développement de nouvelles approches thérapeutiques. Notre étude sera basée sur le potentiel neuroprotecteur et neurorestorateur des lysats plaquettaires pour le traitement de maladies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson (MP) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Le lysat plaquettaire (platelet pellet lysate, PPL) est un acteur majeur de notre système physiologique de réparation/cicatrisation. En effet, plusieurs études ont montré l'impact majeur des lysats plaquettaires, qui contiennent un très grand nombre de facteurs de croissance, en médecine régénérative (grands brûlés, escarre, nécrose osseuse et cutanée,). Nombre de ces facteurs sont d'ailleurs impliqués dans le développement, le maintien et le bon fonctionnement du système nerveux central et périphérique. Des résultats *in vitro* ont montré que les PPL présentent un fort pouvoir neuroprotecteur sur des cultures de neurones dopaminergiques ou de motoneurones présentant un fort stress oxydant induit par différents toxiques afin de modéliser la MP et la SLA respectivement.

Le présent projet vise donc à évaluer l'effet protecteur des PPL obtenus par différentes préparations, dans 3 modèles de souris: la souris intoxiquée au MPTP et la souris lésée unilatéralement à la 6-OHDA, modèles de la MP et la souris transgénique SOD1, modèle de SLA. Un total de 1345 souris sera utilisé au maximum dans ce projet.

Les effets attendus des PPL sont :

- i. Une amélioration des fonctions motrices et comportementales dans les différents modèles
- ii Une neuroprotection et/ou une neurorestauration des neurones dopaminergiques (modèle MPTP et modèle 6-OHDA) et des motoneurones (modèle SOD1) qui dégèrent respectivement dans la MP et la SLA.

Les préparations de PPL seront testées et leur mode d'action étudiés sur les cultures cellulaires disponibles au laboratoire avant d'être utilisés chez l'animal (Remplacement). Nous veillerons à réaliser des études comportementales et histologiques sur les mêmes animaux quand cela est possible (Réduction). Par ailleurs, les conditions d'hébergement seront optimisées et un suivi quotidien des animaux sera effectué pour surveiller l'apparition éventuelle de souffrance ou de points limites pour lesquels des décisions adaptées seront prises (Raffinement).

17365 Le développement d'un modèle animal pertinent et prévisible de la maladie de Parkinson (MP) est un besoin non satisfait pour la communauté de recherche afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la pathologie et pour l'identification et la validation de stratégies thérapeutiques.

Dans ce projet, nous étudierons un modèle de rat dont le gène d'intérêt sera invalidé et en effectuant une caractérisation / validation longitudinale complète de la neuropathologie dans ce nouveau modèle animal de MP. Non seulement cette approche sera utile pour modéliser la MP, mais sa nature polyvalente permettra le développement de modèles imitant d'autres troubles neurodégénératifs dévastateurs qui partagent des caractéristiques communes avec les maladies de surcharge lysosomale. Ce nouveau modèle animal qui sera caractérisé en profondeur offrira de nouvelles perspectives dans la pathogenèse de la MP et sera un outil puissant pour tester et valider des approches thérapeutiques.

Pour chaque état et à chaque génération nous assurerons un suivi rigoureux des animaux de leur naissance à leur mort, afin de garantir que le modèle dispose des caractéristiques propres au développement de la MP mais que le développement de ces événements n'est pas néfaste au Bien-être animal (BEA). Dans le cas contraire, nous mettrons en oeuvre l'ensemble des soins et limiterons la souffrance et le mal être à leur minimum en établissant des points limites stricts.

Pour ce faire 4 « sous-lignées » indépendantes seront suivies. Des individus de chaque sous-clone seront analysés après sacrifice afin de ne sélectionner que la colonie développant les symptômes de la MP.

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 rats nécessaires à l'analyse postmortem est de 96.

Le remplacement est impossible pour ces expériences qui ont pour but de caractériser un nouveau modèle *in vivo*.

Une attention particulière pour le raffinement de notre procédure de perfusion sera apportée pour limiter douleur et stress des animaux.

Enfin, nous leur fournirons les meilleures conditions de vie tout au long du projet puisque le bien-être des animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort.

17366 Dans le cadre de la fabrication de médicaments contenant de l'insuline pour le marché Russe, un test d'identité du produit doit être réalisé.

Trois procédures sont décrites dans ce projet :

L'une utilisant des lapins et les deux autres utilisant des souris. Cet essai permet de vérifier l'activité hypoglycémique du médicament après son injection à un groupe de lapins ou de souris, en comparaison avec une solution d'insuline de référence injectée à un groupe témoin de lapins ou de souris. La glycémie est ensuite mesurée dans différents échantillons de plasma prélevés à différents temps après l'injection.

Mise en place des 3Rs durant le projet :

- Remplacer : Ce test est réglementaire et rentre dans le cadre de la Pharmacopée Russe. Ce test permet de valider l'activité des médicaments à base d'insuline, et aucun test équivalent sans animaux n'est proposé par cette Pharmacopée.

- Réduire : Le nombre d'animaux par étude est fixé par la Pharmacopée Russe à laquelle est multipliée l'estimation de lots clients à tester.

-Ainsi, le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimée à 72 lapins par an, soit 360 lapins pour la durée du projet : test de 9 lots par an environ, avec 8 lapins par lot.

A noter que deux animaux supplémentaires pourront être mis à jeun (aliment), afin de pouvoir être utilisés si un animal des groupes initiaux devait arrêter la procédure pour raisons éthiques. A des fins de si ces animaux supplémentaires ne sont pas utilisés pour ce projet, ils pourront être utilisés dans le cadre d'un autre projet. De fait, au maximum, le nombre total d'animaux potentiellement utilisés dans le cadre de ce projet serait de 90 lapins par an (9 lots / an, avec 10 lapins par lot) soit 450 lapins pour la durée du projet.

-Pour les études employant des souris (2 procédures différentes), au total, le nombre d'animaux utilisés est estimée à 360 souris par an soit 1800 souris pour la durée du projet : test de 15 lots par an, avec 24 souris par lot.

A noter que, si nécessaire, 2 souris supplémentaires pourraient être rajoutées. De fait le nombre maximal de souris utilisées serait de 26 souris par lot soit 390 souris par an et donc 1950 souris au maximum pour la durée du projet.

- Raffiner : Lors des essais :

- Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté à l'espèce, au nombre d'individus et à l'âge de ceux-ci,

- Le milieu d'hébergement sera enrichi avec des moyens adaptés à l'espèce,

- Des points limites sont définis et appliqués durant l'étude,

- Une observation journalière des animaux est réalisée dès leurs réception jusqu'à la fin de l'étude afin de garantir leur bien-être et identifier au plus tôt l'apparition de potentiels points limites.

17367 Notre projet est de comprendre les mécanismes génétiques de la différenciation des lignages cellulaires de l'embryon de souris pendant la préimplantation. Nous nous intéressons plus particulièrement aux différenciations cellulaires qui ont lieu lors des 3 premiers jours chez la souris, correspondant aux 6 premiers jours chez l'humain. Ces tissus ne sont présents que chez les mammifères.

La compréhension des mécanismes à la base de ce « programme du développement » est d'une importance capitale tant d'un point de vue fondamental que pour des applications thérapeutiques visant à utiliser les cellules souches en médecine régénératrice ou à améliorer les techniques de fécondation *in vitro*. L'utilisation de souris est indispensable car à ce jour aucun modèle cellulaire ne peut récapituler ces différenciations.

Ainsi pour identifier et comprendre le rôle de différents facteurs nous utilisons des animaux transgéniques qui permettent l'élimination de gènes ou l'expression de transgènes.

Puisque nous travaillons sur les embryons, ce projet repose sur des prélèvements post-mortem. Dans ce projet, nous utilisons 7 lignées transgéniques qu'il faut identifier. Le génotypage et marquage s'effectue par prélèvement de la dernière phalange (au maximum une par patte et 2 par animal) au 7ème jour post-natal.

Certaines de ces lignées nécessitent une injection de tamoxifen pour être effectives.

De plus nous effectuerons des superovulations par injections d'hormones pour produire un grand nombre d'embryons à partir d'une seule femelle.

Cette demande chiffre le nombre d'animaux à 1488 souris utilisées par an à la fois pour la maintenance et l'expérimentation. En suivant le principe des 3R, ce nombre sera réduit chaque fois que possible y compris en fonction de résultats préliminaires ou publications. Le niveau d'angoisse et de douleurs provoqué lors de l'expérimentation est aussi minimisé et ne dépasse pas celui associé à des injections intrapéritonéales pour un groupe réduit d'animaux et le prélèvement de tissus pour le génotypage. Suite aux modifications génétiques aucun stress ni douleur n'ont été observées par les auteurs de ces modifications (tous ces animaux ont été obtenus de laboratoires commerciaux privés ou par Material Transfer Agreement, aucune création), mis à part les souris APC-Min/+ qui ont donc une procédure d'élevage particulière. Les animaux seront observés quotidiennement afin de suivre leur état général (perte de poids, comportements anormaux). Les animaux sont élevés dans un milieu enrichi (tunnel de carton permettant de nicher) dans l'animalerie.

17368 Chaque année, environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués à travers le monde, responsables de plus de 8 millions de décès. Les traitements contre les cancers ont profondément évolué ces dernières années et l'immuno-oncologie représente aujourd'hui une approche thérapeutique prometteuse dans ce domaine. C'est dans ce contexte que notre laboratoire a fait le choix de développer un anticorps thérapeutique dirigé contre un antigène tumoral particulièrement surexprimée dans le cancer de la vessie et dans le cancer du sein. Différents formats de cet anticorps pourront être envisagés afin de sélectionner celui qui aura à la fois la meilleure efficacité anti-tumorale et le meilleur profil de sécurité chez le patient. Ces anticorps auront comme fonctionnalités majeures d'induire une cytotoxicité spécifique contre la cellule tumorale soit :

- par ADCC (Antibody-dependant cellular cytotoxicity) via l'engagement des récepteurs Fc dans le cas d'anticorps monoclonaux, associé à un recrutement spécifique des cellules NK dans le cas d'anticorps bispécifiques (NKCE, NK Cell Engager),

- par libération d'un agent cytotoxique lié à l'anticorps dans le cas d'anticorps couplés à une drogue cytotoxique (ADC, Antibody Drug Conjugate).

Le présent projet consistera à évaluer l'efficacité cytotoxique spécifique de cet anticorps sur des cellules tumorales *in vivo*.

Le projet s'articulera en plusieurs étapes :

- une première étape permettra d'évaluer les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie de ces anticorps dans le sang périphérique des animaux. Le but est d'optimiser les fréquences et doses d'administration de ces molécules pour l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale.

- dans un second temps, des tests fonctionnels de nos anticorps (ADCC, NKCE, ou ADC) pourront être réalisés *in vitro* avec des cellules immunitaires provenant des souris de notre modèle d'intérêt.
- dans un troisième temps, l'efficacité anti-tumorale de nos anticorps sera évaluée sur des souris porteuses de tumeurs. Différents modèles seront utilisés avec la greffe des cellules tumorales soit en sous-cutanée (SC), soit en intraveineuse (IV). Ces tests *in vivo* permettront d'établir un classement de nos anticorps afin de déterminer notre candidat médicament.

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

- réduire : le nombre nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir les différentes études qui permettront d'investiguer les effets anti-tumoraux et mode d'action de nos anticorps 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. Cette comparaison permettra ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.
- remplacer : 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 de ciblage spécifique de cellules tumorales, impossible à mimer *in vitro*.
- raffiner : Afin de limiter le stress, 2 à 5 animaux sont hébergés 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 et de la SBEA.

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 utilisés dans le projet sera de 8150 souris maximum sur 5 ans.

17369 La lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip (BSCL) est une maladie rare caractérisée par une absence généralisée de tissu adipeux dès la naissance et une insulino-résistance sévère. La BSCL constitue l'une des formes sévères et précoces de diabète insulino-résistant. Dès le plus jeune âge, les patients développent une intolérance au glucose, un diabète, ainsi qu'une dysfonction cardiaque. La BSCL est transmise selon un mode autosomique récessif. En 2001, des mutations dans le gène BSCL2 ont été découvertes chez des patients atteints de BSCL. Le gène Bslc2 code pour une protéine de fonction encore mal connue, la " seipine ". Nos travaux et d'autres ont pu montrer que la seipine était impliquée dans la différenciation adipocytaire et la survie adipocytaire mais sa fonction exacte demeure inconnue. Depuis 2017, nous avons développé et caractérisé le phénotype de souris dont la délétion en seipine est induite spécifiquement dans le tissu adipeux. Cette délétion entraîne en moins de 15 jours une perte de tissu adipeux et en 3 mois le développement d'un diabète de type 2. La caractérisation du phénotype nous a permis de mettre en évidence deux mécanismes physiopathologiques induits :

- la production anormalement élevée de céramides, des lipides cytotoxiques
- l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique

Notre projet de recherche a pour objectif de tester la myriocine, un agent pharmacologique capable d'inhiber la synthèse endogène des céramides, dans le but de soigner les souris lipodystrophiques.

Nous nous sommes efforcés de respecter dans ce projet la règle des 3 R. Le projet préconise l'utilisation d'un nombre total de 160 animaux, ce qui, dans un souci de réduction correspond au nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats significatifs. Pour l'administration par injection intrapéritonéale de la myriocine, nous utiliserons des seringues adaptées et moins traumatisantes comme les seringues adaptées à l'injection d'insuline. En termes d'enrichissement, nous utilisons

systématiquement des cages avec litières et frisottis et soit un igloo soit un tube tunnel, les deux fabriqués en polycarbonate.

Nos expériences chez l'animal sont indispensables pour observer des réponses physiologiques intégrées. Ce projet a une visée translationnelle et pourrait permettre d'identifier des agents pharmacologiques prometteurs pour corriger la dysfonction adipocytaire.

17370 L'ADHD (Attention-deficit/hyperactivity disorder) est un trouble neurodéveloppemental fréquent caractérisé par l'apparition des symptômes d'inattention et d'hyperactivité-impulsivité. L'ADHD peut également affecter le contrôle inhibiteur, la mémoire de travail, la planification et le processus de récompense. En effet, des études récentes soulignent l'hypersensibilité à la douleur chez l'adulte atteint d'ADHD et suggère une comorbidité possible de l'ADHD et de la douleur.

Le cortex cingulaire antérieur (ACC) est une des structures cérébrales majeures qui participent au contrôle des voies descendantes vers la moelle épinière impliquées dans la modulation du transfert de l'information douloureuse dans la corne dorsale de la moelle épinière. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse d'une éventuelle implication de l'ACC dans les mécanismes à l'origine des dysfonctionnements des contrôles descendants (projections de neurones du cerveau vers la moelle épinière) chez les patients atteints du syndrome ADHD. Cependant, l'étude des réseaux neuronaux impliqués dans les interactions entre l'ADHD et la douleur ainsi que les mécanismes sous-jacents restent encore peu étudiés. Le but de notre projet est de comprendre, chez un modèle animal d'ADHD, les mécanismes à l'origine des effets croisés entre ces deux pathologies.

Dans cette étude, la réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité inter-individuelle), le nombre de souris utilisées dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas ainsi 12 animaux par groupe. La réalisation de ce projet dans son ensemble nécessite l'utilisation de 288 souris C57Bl6-J. Le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale et aucun modèle *in vitro* (cellules ou tissus) ne peut reproduire les conditions des pathologies étudiées. Dans toutes les procédures où cela sera possible, un antalgique sera donné. Pour les autres procédures, les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne renforcée, et les points limites définis permettront de maîtriser cette douleur.

17371 La capacité à prendre une décision adaptée dans un environnement en perpétuel changement est capitale pour la survie des organismes. Cette capacité repose sur de multiples processus élémentaires qui sont largement conservés chez les mammifères. Pour cette raison, l'utilisation de rongeurs permet effectivement de disséquer chez l'animal des fonctions cognitives de haut niveau, fortement intégratives, qui, par définition, ne peuvent s'étudier qu'à l'échelle de l'organisme entier. L'utilisation de rongeurs permet de procéder à des études fonctionnelles permettant ainsi de clarifier les bases neurobiologiques de la prise de décision, ce qui est un enjeu important non seulement en termes de recherche fondamentale, à la croisée entre des disciplines aussi variées que la neurobiologie, la psychologie expérimentale ou encore plus récemment la neuroéconomie, mais également en termes de recherche biomédicale puisque la prise de décision est inadaptée dans nombre de pathologies mentales comme la schizophrénie ou l'addiction.

Ce projet d'une durée de 4 ans, mené sur le Rat et nécessitant l'emploi d'un total de 590 animaux vise à clarifier les bases fonctionnelles de l'architecture corticale permettant une décision adaptée.

Pour ce faire, nous procéderons à i) des études de neuroanatomie visant à la description de l'architecture des régions frontales et leurs neuromodulation ii) des manipulations fines, réversibles et peu invasives de certains neurones du réseau sélectionnés selon leurs projections spécifiques dans des épreuves comportementales modélisant certain aspect spécifique de la prise de la décision ii) des enregistrements de l'activité neuronale au sein des réseaux et sous réseaux neuronaux.

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 dans le cas où les mesures de prises en charge de la douleur et de l'inconfort résultant éventuellement de l'étape chirurgicale ne seraient pas suffisantes.

17372 L'obésité et la résistance à l'insuline sont liées à une lésion de la paroi des vaisseaux et au développement d'athérosclérose par hyperplasie des cellules musculaires lisses vasculaires et l'infiltration des monocytes/macrophages dans la paroi vasculaire. Des travaux antérieurs de notre laboratoire indiquent l'implication des vésicules extracellulaires circulantes issues de patients avec des maladies métaboliques dans les altérations vasculaires et l'inflammation associées avec le développement d'athérosclérose. Aujourd'hui, des études préliminaires de notre laboratoire indiquent la présence des protéines NLRP3, la forme non mature d'IL-1 β et PTP1B et dans les vésicules extracellulaires de ces patientes. Ces deux protéines sont impliquées, de manière indépendante, dans les altérations métaboliques et le processus inflammatoire développées dans l'obésité et le diabète, mais leur implication directe dans le développement de l'athérosclérose n'est pas complètement élucidée. L'objectif de notre projet sera d'évaluer l'impact de ces protéines NLRP3, pro-IL1 β et PTP1B présents dans les vésicules extracellulaires sur le développement de l'athérosclérose, de l'obésité et de l'inflammation, chez la souris.

Pour une meilleure compréhension de l'implication de NLRP3, IL-1 β et PTP1B dans le développement de l'athérosclérose, nous allons à utiliser dans notre projet des souris wild type et knock-out pour NLRP3, IL-1 β , PTP1B, et ApoE, un modèle de souris présentant une prédisposition à développer l'athérosclérose. Pour atteindre le stade de développement d'athérosclérose, des animaux de 8 semaines seront nourris avec un régime standard ou un régime riche en graisse et étudiées après 16 semaines de traitement pour comparer l'évolution de la plaque d'athérome et le processus inflammatoire. Différent paramètres anatomiques, cardiologiques et biochimiques seront évalués. Aussi, les organes prélevés seront analysés par différentes méthodes pour quantifier les dysfonctionnements métaboliques, inflammatoires et vasculaires, et l'avancée de l'athérosclérose.

En parallèle, les vésicules extracellulaires de chaque modèle de souris nourrit avec un régime standard ou riche en graisse seront isolées et utilisées pour évaluer leur effet *in vitro*, sur cellules monocytaires isolées à partir de la moelle osseuse et des cellules musculaires lisses d'aorte murine. Également, les effets des vésicules extracellulaires seront étudiés *in vivo*, après l'injection à des souris wild type et knock-out pour ApoE, NLRP3, IL-1 β et PTP1B afin d'évaluer leurs effets sur l'obésité et l'athérosclérose.

Le nombre total de souris engagées dans ces expériences est évaluée au nombre de 390 pendant 5 ans, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner ». REDUIRE : Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats. RAFFINER : l'étude a été raffinée en développant un suivi rigoureux des souris tout au long du protocole en mesurant la quantité de nourriture absorbée ainsi que le poids de chacune des souris. 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, y compris l'éventuelle perte de poids. Le bien-être des animaux sera donc évalué de façon complémentaire et hebdomadaire en observant leur comportement et les indices pouvant suggérer une douleur au moyen du score de grimace. REMPLACER : 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 un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces.

Ce travail permettra de préciser le rôle des protéines NLRP3, IL-1 β et PTP1B dans l'évolution de l'inflammation et altérations métaboliques conduisant à l'athérosclérose chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies préventives de l'inflammation associée au développement de l'athérosclérose basées sur l'utilisation de inhibiteurs pharmacologiques des protéines NLRP3, IL-1 β et PTP1B.

17373 Les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (MICI) sont des pathologies constituant un véritable enjeu de santé publique, puisqu'elles sont particulièrement handicapantes, incurables actuellement, et les approches de prise en charge des symptômes sont d'une efficacité relative. Ces pathologies sont multifactorielles et complexes. Elles se manifestent par des poussées inflammatoires plus ou moins longues et fréquentes selon les patients. Dans ce contexte, comprendre les facteurs impliqués dans le déclenchement des MICI est indispensable pour établir de nouvelles prises en charge des patients, en particulier des approches préventives chez les patients à risque (prédisposés génétiquement en particulier).

Des études épidémiologiques indiquent qu'un apport calorique important et le surpoids semblent être associés à un risque augmenté de MICI et des prises en charge plus compliquées des patients. De plus, des études expérimentales sur des souris transgéniques obèses ont confirmé une exacerbation de l'inflammation. A l'inverse, une diminution de l'apport calorique semble avoir un effet bénéfique sur certaines pathologies inflammatoires. Compte tenu de ces observations, la compréhension des mécanismes liant l'apport calorique et l'inflammation intestinale est importante.

Notre étude consiste d'une part à comparer la sévérité de l'inflammation intestinale induite par un agent colitogène chez des souris préalablement soumises à différents régimes alimentaires hypercaloriques et d'autre part à identifier les mécanismes cellulaires et physiopathologiques responsables de la modulation de la sévérité de l'inflammation. Pour cette deuxième partie, nous allons nous focaliser sur un mécanisme impliquant le gène NOD2 (et sa voie de signalisation) qui est un gène de susceptibilité aux MICI. Compte tenu des différences entre homme et femme au niveau de la physiologie du stockage et de l'utilisation des composés énergétiques, nous prévoyons d'étudier uniquement des souris mâles dans un premier temps. La physiologie de l'intestin est complexe et la réponse inflammatoire implique de nombreux acteurs présents dans l'ensemble de l'organisme d'où l'utilisation de modèle *in vivo*, sur des souris car il existe des modèles transgéniques permettant d'étudier les maladies métaboliques en lien avec le surpoids.

Sous réserve de résultats prometteurs, les expériences de ce projet impliqueront un maximum de 240 souris sur une période proposée de 2 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: 1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche *in vitro* car l'étude porte sur un régime alimentaire et la nutrition fait intervenir des processus physiologiques complexes qui interagissent. 2. Réduction : -Effet aggravant du régime hyperglucidique chez des souris Wild Type (C57BL/6) en comparaison à 3 lignées de souris transgéniques. Chaque groupe sera subdivisé en sous-groupes de manière arbitraire : traités ou non traités avec l'agent colitogène (DSS à 2%). Le nombre de souris utilisées dans cette étude est déterminé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux. 3. Raffinement : toutes les procédures expérimentales (régime spécial, traitement pro-inflammatoire, ...) auront lieu dans un environnement sécurisant pour l'animal. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé 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 de plus de 20%, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation). En fin de protocole, les animaux seront euthanasiés et des organes prélevés pour permettre des analyses biologiques.

17374 Les plaquettes, sont des cellules sanguines dépourvues de noyau produites par fragmentation des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Elles ont un rôle essentiel dans la prévention et l'arrêt de saignements. Elles circulent chez l'homme pendant 7 à 10 jours, entre 3 et 5 jours chez la souris avant d'être éliminées par la rate et/ou le foie. Plusieurs études ont décrit une modification des plaquettes sanguines au cours de leur vieillissement, notamment au niveau de marqueurs de surface, mais les signaux responsables de leur élimination ne sont pas encore compris. Il serait pourtant clé de comprendre et de caractériser les mécanismes qui conduisent à l'élimination des plaquettes notamment dans un contexte transfusionnel. En effet, les plaquettes transfusées ne circulent que pendant 4 jours environ chez l'homme et environ 20 à 30% des plaquettes sont éliminées pendant les premières 24h.

Caractériser les signaux menant à l'élimination des plaquettes pourrait permettre d'améliorer le rendement transfusionnel.

Afin de pouvoir caractériser finement les modifications qui apparaissent au cours du vieillissement des plaquettes, il est nécessaire d'empêcher ou de retarder leur élimination de la circulation car par définition l'expression de ces signaux entraîne leur élimination immédiate de la circulation et ne sont donc plus détectables. Dans ce but, nous transfuserons des plaquettes dites « jeunes » provenant de souris dont il est possible d'isoler des plaquettes synchrones en âge dans des souris qui auront été au préalable spléectomisées (pour éviter une élimination dans la rate) ou dans des souris traitées avec un composé permettant d'éliminer à la fois les macrophages de la rate et du foie. Le vieillissement des plaquettes transfusées dans ces différentes conditions sera analysé par cytométrie en flux grâce à des prélèvements de petites quantités de sang.

Réduire : Tous les tests pour mettre au point les immunomarquages ainsi que l'acquisition au cytomètre seront réalisés sur un même prélèvement. Les conditions expérimentales déterminées ainsi seront utilisées pour toutes les autres expériences. De plus, les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives.

Remplacer : l'étude des modifications phénotypiques des plaquettes sanguines au cours de leur vieillissement ne peut être réalisé *in vitro*, car les plaquettes s'activent spontanément dans ces conditions, Elle peut donc se faire uniquement au moyen de modèles *in vivo*.

Raffiner : 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 cellulose et des lanières de papier afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux.

- Accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

- Anesthésie et antalgie de l'animal avant et pendant la durée des procédures expérimentales afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés.

- Prise en charge péri-opératoire à l'aide d'une fiche de suivi pour évaluer l'état des animaux et veiller à leur bien être tout au long de l'expérimentation. Des critères d'interruption en fonction de l'aspect clinique des animaux (grille des score) seront mis en place afin de limiter le stress et la souffrance des animaux.

Ce projet nécessitera 149 souris.

17375 -Contexte scientifique, médical et social : A ce jour, environ 14% des adultes sont obèses et l'on considère que la moitié des adultes français sont en surpoids. Cette prévalence de l'obésité concerne toutes les tranches d'âges et s'accompagne de maladies métaboliques comme le diabète type 2 et la stéatose hépatique. L'altération de nos rythmes biologiques endogènes engendrée par notre mode de vie moderne et irrégulier (e.g. le travail en horaire décalé et les modifications de nos habitudes de prises alimentaires) contribue à la survenue de ces pathologies. Cependant, les liens moléculaires entre l'altération de nos rythmes biologiques et l'apparition de ces pathologies sont mal, voire pas compris du tout.

Les rythmes biologiques endogènes sont générés par l'horloge circadienne et maintiennent l'homéostasie métabolique. Chez les mammifères, un pacemaker situé dans l'hypothalamus et synchronisé par la lumière régule les fonctions physiologiques comme le cycle de veille/sommeil, le comportement alimentaire, la pression artérielle et la température corporelle. Bien que synchronisée par cette horloge "centrale", les organes périphériques comme le foie possèdent aussi leur horloge intrinsèque. Dans les hépatocytes par exemple, le rythme alimentaire a un fort pouvoir synchronisateur sur l'horloge circadienne hépatique et l'expression des gènes régulant le métabolisme énergétique et nutritionnel.

-Description des objectifs du projet : À ce jour, les oscillations journalières de l'expression des gènes ont été intensivement étudiées au niveau transcriptionnel et au niveau du transcrit (ARN messenger = ARNm). Au niveau du protéome, qui constitue la partie exprimée du génome, nous avons caractérisé

le protéome hépatique à la plus grande échelle à ce jour. Nos travaux ont montré le rôle clé des modifications post-traductionnelles (PTMs) comme la phosphorylation ou l'acétylation dans leur régulation. Bien que les PTMs susmentionnées constituent des régulateurs clés du métabolisme, le répertoire des PTMs est extrêmement vaste. Ainsi, l'exploration des PTMs circadiens n'en est qu'à ses balbutiements et constitue l'un des prochains défis majeurs dans le domaine de la recherche en chronobiologie et du métabolisme. Notre projet vise donc à étudier la régulation journalière/diurne des PTMs liées au métabolisme ainsi que leur rôle dans les maladies métaboliques liées au diabète de type 2 et à l'obésité.

-Notre hypothèse est que la perturbation de ces PTMs sont impliquées dans l'apparition des maladies métaboliques associées aux altérations de l'horloge circadienne tel que l'obésité. Lors de désordre métabolique comme l'obésité, la perturbation de l'horloge circadienne et du comportement alimentaire comme l'alimentation pendant la phase d'inactivité (i.e. phase de jour chez la souris) s'accompagne d'une perturbation de la dynamique de ces PTMs. À l'inverse, restreindre l'alimentation à la phase d'activité (nuit pour la souris) prévient les perturbations métaboliques en rétablissant cette dynamique.

-Par conséquent, dans ce projet nous étudierons la dynamique temporelle de ces PTMs et les conséquences de la perturbation de l'horloge circadienne et du rythme alimentaire sur cette dynamique. Ensuite, nous étudierons le potentiel thérapeutique de la modification du niveau globale de ces PTMs. Ce protocole nécessite 1936 souris. Nous respecterons la loi des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Nous limiterons cette étude préclinique de physiopathologie métabolique aux expériences indispensables. Dans un but de réduction, la caractérisation initiale de la dynamique temporelle du niveau de PTMs permettra de réduire le nombre de souris dans nos futures études.

Nous minimiserons l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des souris afin d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en termes de "bien-être" animal. Dans un but de raffinement, des expérimentations pilotes sur un nombre réduit de souris valideront l'efficacité des procédures de classe modérée (cohorte 4). L'expérimentation animale reste nécessaire afin d'étudier les réactions de l'organisme soumis à l'ensemble des contrôles nerveux, hormonaux et humoraux mis en place par l'horloge circadienne. Les souris C57Bl6 soumises à un régime gras sont un modèle validé pour l'étude du métabolisme.

17376 Le but de ce projet est d'étudier la cicatrisation cutanée chez des souris femelles gestantes. En effet, il a été montré que durant la gestation, un faible nombre de cellules fœtales passent dans la circulation maternelle tout au long de la grossesse, sont tolérées par le système immunitaire et persistent pendant plusieurs décennies (principalement dans la moelle osseuse). Des études antérieures ont montré la présence/recrutement spécifique de ces progéniteurs fœtaux dans les tissus lésés (foie, cerveau, cœur et peau). Ces dernières participent à la réparation cutanée, et pourraient avoir un avantage sélectif lorsque celle-ci est altérée (restauration du phénotype sauvage). Des travaux en cours de soumission réalisés par l'équipe ont mis en évidence l'implication de la voie de signalisation CCR2/CCL2 sur la mobilisation des cellules fœtales au sein des plaies maternelles.

Les défauts de cicatrisation constituent en pathologie humaine un problème de santé publique dans les pays occidentaux mais aussi dans ceux en voie de développement. De manière plus précise, 1 à 2% des personnes vivant dans le monde occidental développera un ulcère des membres inférieurs. Chaque année, aux Etats Unis, il y a 6,5 millions de personnes présentant des ulcères chroniques. En Europe, 5 à 15 % des personnes âgées entre 30 et 70 ans sont atteints d'une insuffisance veineuse des membres inférieurs, parmi lesquelles au moins 1% seront compliquées d'ulcère variqueux. Aux Etats Unis, le coût global lié aux soins et à la morbidité des plaies cutanées est estimé à 13 à 15 milliards de dollars par an et celui des traitements des ulcères veineux à lui seul s'élève à 3 milliards. Il apparaît donc important de développer de nouveaux traitements efficaces et facilement accessibles pour les problèmes de cicatrisation cutanée.

Type d'animaux : Nous utiliserons dans le cadre de ce projet 3 modèles murins transgéniques sur fond génétique C57BL/6J :

- un modèle CaG-eGFP permettant une expression de la GFP, pour suivre le devenir des cellules fœtales ;

- un modèle CCR2 KO afin d'observer l'effet de l'inactivation la voie de signalisation CCR2/CCL2 les cellules fœtales circulantes ;
- un modèle CCR2 KO GFP afin de suivre le devenir de ces cellules en l'absence de la voie de signalisation CCR2/CCL2.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 58 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.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans la cicatrisation.

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 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 et des soins adaptés.

17377 Le corps humain produit chaque jour 100 milliards de globules rouges et plusieurs milliards de globules blancs à partir d'un petit contingent de cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes dans la moelle osseuse. Ces CSH ont la capacité de se multiplier à l'identique (autorenouvellement) et de se différencier en cellules matures du sang (multipotence). Lorsque les propriétés des CSH sont altérées, il peut se produire une leucémie. Il est donc essentiel de comprendre le fonctionnement des CSH normales pour mieux saisir les mécanismes altérés au cours du processus leucémique.

Nous avons identifié une protéine majeure dans le développement physiopathologique de la leucémie. Afin de mieux comprendre son rôle dans la fonction de reconstitution et de régénération des CSH, nous allons utiliser une lignée de souris constitutive n'exprimant pas cette protéine spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques. Cette lignée ne présente pas de phénotype dommageable.

Nous voulons prélever du sang sous anesthésie pour analyse des paramètres sanguins de ces animaux mutants :

- au stade adulte jeune (8-12 semaines) ;
- au cours de vieillissement jusqu'à au moins 20 mois ;
- après injection par voie intraperitonéale à des animaux de 8-12 semaines d'une drogue cytotoxique détruisant les cellules hématopoïétiques. Le suivi sur 4 semaines des paramètres sanguins permet de qualifier les capacités de reconstitution des CSH et ainsi de comparer les capacités de régénération des CSH des animaux mutants/ contrôle.

Les résultats obtenus dans le modèle animal devraient éclairer le rôle de cette protéine régulatrice dans l'hématopoïèse normale et conduire à identifier de nouvelles voies intracellulaires, futures cibles thérapeutiques, impliquées dans la croissance leucémique.

En conformité avec les exigences 3R :

- Des expériences préliminaires (mise en cultures des cellules souches et analyse de leur capacité d'expansion) sont réalisées *in vitro* comme première approche mais il n'est pas possible à l'heure actuelle de récapituler *in vitro* ou *in silico* les processus physiopathologiques intervenant au cours de

l'initiation et de la progression d'un cancer tel que les leucémies. Il est également impossible d'isoler en nombre suffisant les CSH dans leur habitat naturel, la moelle osseuse humaine.

-Des lots d'un nombre minimal d'animaux nécessaires seront utilisés en anticipant la validité statistique des données obtenues (réduction).

-Des mesures visant à réduire la douleur des animaux seront prises. Ainsi tous les prélèvements sanguins se feront sous anesthésie générale. Un suivi attentif des animaux est prévu, des points limites ont été définis pour éviter la douleur.

- Les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et de "maison-abri" en carton. Une surveillance attentive et des soins adaptés (réduction de la douleur si nécessaire) seront apportés afin de garantir le bien-être des animaux (raffinement)

Le nombre total d'animaux expérimentés est estimé à 80 souris pour l'ensemble du projet qui se déroulera sur trois ans.

17378 Les études sur la physiologie humaine ou animale et les études pharmacologiques (y compris les études sur la douleur) nécessitent généralement l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés qu'il est impératif réglementairement d'identifier individuellement. La méthode d'identification la plus utilisée en animalerie de recherche est le tatouage des pattes (doigts-coussinets) qui est réalisée avant 10j chez le souriceau en accord avec la législation européenne (directive 2010/63/UE).

Récemment, il a été démontré qu'une autre méthode d'identification individuelle (amputation des phalanges de nouveaux-nés) avait un impact à long terme sur la sensibilité nociceptive et somatosensorielle analysées notamment dans les études sur la douleur.

Le présent projet a donc pour but de définir si l'identification individuelle par tatouage des pattes a un impact sur les seuils nociceptifs mécaniques et thermiques ce qui présente un intérêt majeur en terme de connaissance scientifique pour l'ensemble de la communauté scientifique qui travaille sur la douleur et qui utilise des animaux génétiquement modifiés tatoués. En effet, la directive 2010/63/UE oblige à réduire le nombre d'animaux ce qui implique de fait de limiter les biais expérimentaux.

Sachant que le niveau d'anxiété des animaux peut également impacter les seuils nociceptifs, une première partie de cette étude permettra également de comparer, à l'aide de 3 tests comportementaux, si le mode de change (préhension par la queue versus utilisation d'un tunnel) qui peut moduler le niveau d'anxiété des animaux peut influencer également les seuils nociceptifs. Cela permettra d'évaluer le bénéfice éventuel pour le bien être des animaux afin de pouvoir ensuite promouvoir le mode de change avec tunnel à l'ensemble des animaleries de recherche et ainsi raffiner les pratiques zootechniques.

Le projet sera mené sur des souris mâles pour la première partie de l'étude (impact du mode de change sur le niveau d'anxiété) et sur des mâles et femelles pour la deuxième partie. Il nécessitera au total l'utilisation de 62 souris et sera conduit dans le respect de la règle des 3 "R".

REMPLETER: La nociception et la douleur font appel à des circuits neuronaux impliquant de nombreuses structures nerveuses interconnectées ce qui rend ces circuits complexes et à l'heure actuelle, il n'est pas possible de les reproduire *in vitro* ou *in silico*. De plus, la caractérisation de la douleur et de l'anxiété nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile. Il n'est donc pas possible de remplacer l'animal dans le projet.

REDUIRE: Le nombre d'animaux par lot a été estimé sur la base des analyses statistiques à réaliser et du seuil significatif qu'elle requiert. L'utilisation d'une souche consanguine nous permettra de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Afin de diminuer également le nombre d'animaux, certaines procédures détaillées ci-après feront partie d'un enchaînement compatible avec le bien être de l'animal.

RAFFINER: Les animaux seront hébergés en cohorte, feront l'objet d'observations quotidiennes et disposeront d'enrichissements systématiques leur permettant d'exprimer leurs comportements naturels (bâtons à ronger, carré de coton ou frisure pour la nidification). Des points limites prédictifs ont été établis pour chaque procédure. Ainsi lorsque cela sera nécessaire, des décisions seront prises en accord avec le vétérinaire et la Structure du Bien Être Animal pour soustraire l'animal à la souffrance.

17379 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. Le suivi du développement de la leucémie, avant et après traitement, sera réalisé par palpation de la rate à travers la peau (sur souris éveillée) ou par détection des cellules leucémiques dans la moelle osseuse. Pour ce faire, une ponction de quelques microlitres de moelle osseuse sera réalisée sous anesthésie générale et analgésie au niveau du fémur de la souris (2 prélèvements maximum à 2 semaines d'intervalle).

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.

17380 Chaque année, le DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques, en suivant les objectifs du Programme Pédagogique National, contribue à la formation des futurs techniciens de

laboratoire. Pour ce faire, l'enseignement de la Physiologie Animale est un pilier indispensable dans leur formation. Cet enseignement se présente notamment sous forme de travaux pratiques (TP), dont une partie se déroule sur des rats. Ces travaux pratiques permettent de familiariser les étudiants avec l'éthique et les pratiques de l'expérimentation animale : de la réglementation à l'expérience en passant par le respect du bien-être animal.

Lors des deux premières séances, les étudiants prendront connaissance de l'anatomie des rats, apprendront à contrôler l'anesthésie et la douleur et seront formés aux techniques de dissection et de pose de cathéters. Tout cela permettra non seulement aux étudiants d'apprendre les gestes chirurgicaux simples à utiliser avec les animaux de laboratoire, mais également de les sensibiliser à la gestion de la douleur et du stress. Une fois que les étudiants auront acquis les bases de l'expérimentation animale, ils passeront à l'apprentissage de la mesure du volume sanguin et à l'observation des fonctions rénales du rat pendant les deux dernières séances.

L'expérimentation animale est un prérequis de la formation et doit être enseignée au regard du Programme Pédagogique National. Néanmoins dans un souci de remplacement, celui-ci est appliqué quand cela est possible en testant des réponses physiologiques sur les étudiants eux même, par exemple lors de l'exploration de la physiologie cardiaque (mesure de pression artérielle...), ou l'utilisation d'organismes simples (ver de terre) à la place d'animaux supérieurs pour l'étude de la physiologie nerveuse. Dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux, les étudiants travailleront en binôme en utilisant un rat pour deux. Il est cependant nécessaire de ne pas élargir à des trinômes ou plus car les compétences techniques ne pourraient pas être validées.

Le bien-être animal est une préoccupation de premier plan, donc l'enseignant référent et le technicien de laboratoire habilité sont formés à la prise en charge de la douleur et réaliseront l'analgésie - anesthésie des animaux quelques minutes avant le début de la séance (afin de réduire leur stress) ainsi que le maintien de la profondeur de l'anesthésie si nécessaire et la mise à mort des animaux. Toujours dans cette optique, le choix des instruments est adapté aux techniques de chirurgie et l'enseignant prendra soin de présenter des gestes chirurgicaux adaptés afin d'éviter au maximum les lésions des tissus, sources de douleurs. Concernant l'hébergement, les rats sont élevés dans les conditions réglementaires et leur bien-être est une priorité (acclimatation, enrichissement, surveillance quotidienne, change régulier, nourriture et boisson à volonté...). Pour réaliser ces TP, il faut 120 rats maximum pour former 56 étudiants chaque année soit 600 rats maximum pour 5 ans.

17381 La maladie rénale chronique (MRC) peut résulter d'une agression rénale aiguë (ARA) préalable. Les mécanismes qui relient l'ARA et la MRC sont mal connus alors qu'ils représentent des cibles potentielles pour le développement de thérapeutiques protectrices. Il existe plusieurs situations responsables d'agressions rénale aiguës chez l'homme, avec des mécanismes physiopathologiques différents. Certaines de ces situations peuvent bénéficier de traitements protecteurs spécifiques sous réserve d'en connaître préalablement les mécanismes physiopathologiques. Ce projet consiste donc à identifier certains mécanismes pathogènes mis en jeu lors de l'ARA et à en moduler l'impact par d'éventuelles interventions pharmacologiques. Depuis quelques années nos travaux se sont essentiellement centrés sur les actions rénales des stéroïdes sexuels, en particulier les œstrogènes qui ont déjà démontré des effets protecteurs vasculaires sur d'autres organes et dans d'autres types d'agressions. Dans la continuité de ces travaux, nous nous centrerons sur l'action néphroprotectrice des œstrogènes et d'autres molécules approchantes seront également testées. Ce projet a été élaboré de façon à respecter la règle des 3R : 1) remplacement : l'ARA et les lésions qu'elle provoque mettent en jeu des mécanismes physiopathologiques complexes, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux vivants permettant d'obtenir un niveau d'anthropomorphisme pertinent ; 2) réduire : les modèles expérimentaux sont bien maîtrisés par les expérimentateurs impliqués, ce qui évite les étapes de mise au point coûteuses en animaux. Le nombre d'animaux utilisé est calculé au plus juste d'après notre connaissance du modèle pour permettre d'identifier statistiquement des différences intergroupes scientifiquement interprétables pour chaque paramètre principal et chaque modèle. Il est prévu d'utiliser un maximum de 528 souris ; 3) raffiner : les animaux seront hébergés par groupes de 4 dans des cages comprenant des éléments d'enrichissement (papier, tunnels.), avec alimentation et eau ad libitum. Ils seront observés quotidiennement afin de s'assurer de

leur bien-être. Les personnels intervenant dans ce projet sont formés à l'expérimentation animale et à la chirurgie et les procédures sont optimisées de façon à limiter au maximum la souffrance des animaux (anesthésie, analgésie, suivi attentif des animaux tout au long des différentes procédures). Des points limites ont été définis : 1) Perte de poids supérieure à 20% du poids initial ; 2) Posture de prostration ou léthargie au-delà de 24 heures après la chirurgie ; 3) Signes de souffrances (comportement ou apparence anormaux, présence de lésions, absence de toilette...) sans amélioration pendant plus de 24h. Si un de ces points est atteint au cours du protocole, les animaux concernés seront euthanasiés.

17382 La capacité à détecter et prédire le passage du temps et à représenter des stimuli sensoriels variant dans le temps est fondamentale pour le fonctionnement du cerveau. Cependant, comment les circuits neuronaux codent le temps, et comment le cerveau surmonte les différences de vitesse de traitement entre différents systèmes sensoriels, demeurent des questions ouvertes en neurosciences. Les premières études sur la production d'intervalles temporels précis et leur perception, ainsi que sur les aspects temporels de l'apprentissage associatif, se sont focalisées sur l'hippocampe et le cortex, mais ce sont les lésions du cervelet qui éliminent l'apprentissage du clignement de l'œil au bon moment avant une bouffée d'air aversive en réponse à des stimuli sensoriels prédictifs.

Cette tâche de clignement de l'œil conditionné avec délai est un paradigme comportemental puissant pour étudier directement les mécanismes cellulaires et de circuit de l'apprentissage temporel. De plus, ce comportement est perturbé chez des patients du spectre autistique et dans des modèles de souris génétiquement modifiées. Cependant, les mécanismes cellulaires de ce comportement demeurent inconnus. De nouvelles propriétés ont été découvertes dans la toute première étape du circuit du cervelet, au niveau des contacts (appelés synapses) entre les neurones qui amènent l'information sensorielle dans le cervelet et les cellules en grain (les neurones les plus nombreux dans le cerveau), lesquels sont les premiers dans le cervelet à combiner les informations de plusieurs sens. Nous avons incorporé ces mécanismes dans un modèle théorique du cervelet simulé numériquement, afin de prédire comment les propriétés de ces synapses impactent l'activité des neurones dans les étapes successives du traitement en réponse à des stimuli sensoriels. Cette simulation numérique remplace des expériences préliminaires qui auraient dû être effectuées chez l'animal. Nous allons maintenant valider et raffiner ce modèle avec des expériences de comportement (conditionnement du clignement de l'œil ; discrimination de durée des sons) *in vivo* chez la souris éveillée.

Nous établirons les tâches comportementales en collaboration avec des experts mondiaux avec lesquels nous travaillons déjà. Comme nous avons également montré que les synapses relayant différents types d'informations sensorielles ont des propriétés dynamiques différentes, nous allons tester la prédiction que les fenêtres temporelles pour l'apprentissage du clignement de l'œil varient selon le type de stimuli sensoriels utilisés (son, lumière ou toucher des vibrisses). Enfin, avec les outils optogénétiques - qui permettent de manipuler finement l'activité de neurones choisis par l'expression de protéines photosensibles (opsines) et l'illumination des cellules ciblées au moment voulu - nous allons tester si certains types de synapses (avec un type de plasticité à court terme donné) définissent ces fenêtres d'apprentissage temporel, ainsi que l'implication du cervelet dans une tâche de discrimination temporelle auditive. La suppression d'activité des synapses par l'optogénétique va demander l'injection virale des opsines et l'implantation chronique de fibres optiques pour illuminer les neurones exprimant les opsines dans les noyaux pré-cérébelleux.

Ces techniques sont très bien établies chez la souris, qui est ainsi un modèle expérimental approprié pour ce projet. Son cervelet a une organisation similaire à celui des autres mammifères (y compris les humains). Les souris peuvent également être entraînées à rester éveillées sans stress avec leur tête fixée, permettant l'étude des circuits neuronaux pendant le traitement de l'information sensorielle *in vivo*. L'utilisation de souris est aussi basée sur une logique de remplacement d'autres modèles animaux tels que les primates.

L'utilisation d'animaux est nécessaire à ce stade car nous n'avons pas assez d'information sur le circuit pour le reconstruire entièrement dans un modèle informatique. Il est nécessaire d'utiliser l'animal entier plutôt que des tranches de cerveau ou des cellules en culture, car le circuit doit être entièrement préservé, les stimuli sensoriels doivent être pré-traités par le système sensoriel adéquat (par ex. auditif)

avant d'arriver au cervelet, et le comportement de la souris (clignement de l'œil ou léchage) est le résultat final de l'apprentissage temporel que nous allons étudier.

Nous avons besoin de 480 animaux sur 5 ans, inclus dans 2 procédures de sévérité modérée. Cette estimation est basée sur notre expérience dans les études de ce type et nous avons vérifié par biostatistique que nous utiliserons le nombre minimal d'animaux nécessaires pour atteindre le but scientifique visé.

Ce projet peut avoir des effets néfastes sur les animaux (douleur ou infection post-opératoires, très rare perte d'implant crânien, très rare déshydratation suite à la restriction hydrique utilisée pour motiver l'apprentissage), que nous minimiserons à toutes les étapes. Nous utilisons des analgésiques pour réduire la douleur et des techniques chirurgicales aseptiques pour prévenir le risque d'infection. Le poids des animaux soumis à la restriction hydrique sera suivi quotidiennement et l'eau sera donnée à volonté en cas de perte de poids >20%. Le raffinement de nos techniques consiste aussi en l'enrichissement de l'habitat des animaux et à l'administration de récompenses pour diminuer le stress des animaux lorsqu'on les entraîne à certaines tâches.

17383 De nombreuses espèces de poissons marins sont présentes au stade juvénile dans les zones de nurseries côtières. Dans ces zones, la survie des juvéniles dépend de plusieurs facteurs comme la qualité de l'eau, la pêche, la présence de nourriture, ou encore la prédation. La capacité à détecter un prédateur dépend en grande partie de leurs systèmes sensoriels. Cependant cette capacité est susceptible d'être impactée par des facteurs environnementaux. Différentes études réalisées principalement chez des espèces de poissons tropicaux indiquent en effet que l'olfaction, la vision et l'audition des poissons pourraient être impactées par un facteur associé au changement global, à savoir l'acidification des océans. Si de nombreuses études ont été réalisées chez les poissons des récifs coralliens, très peu d'informations sont disponibles chez les espèces de poissons des zones tempérées. Ces informations sont pourtant nécessaires afin de mieux évaluer les conséquences écologiques du changement global (notamment l'acidification et le réchauffement des océans) sur la dynamique des populations de poissons d'intérêt écologique et halieutique. Dans le cadre de ce projet, nous proposons de mieux caractériser (i) la réaction comportementale des juvéniles de bar européen (*Dicentrarchus labrax*) vis-à-vis d'un potentiel prédateur et surtout (ii) l'effet du pH et du réchauffement des océans sur cette réaction. Cette étude va être réalisée via la mise en œuvre d'approches fonctionnelles (tests comportementaux) et mécanistiques (étude moléculaire d'acteurs impliqués dans les capacités sensorielles). Ces analyses seront réalisées chez des juvéniles qui seront acclimatés à deux pH (pH 8.0 condition de pH actuel des océans; pH7.6: condition de pH des océans prédite pour 2100) ainsi que deux températures (température ambiante saisonnière; température ambiante +5°C simulant le réchauffement climatique). Les tests comportementaux consisteront à analyser la réaction comportementale des juvéniles de bar dans des environnements où seront appliqués des stimuli sensoriels olfactifs (odeur d'un prédateur), visuels (vue d'un prédateur) ou mécano-acoustiques. 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, à savoir 432, 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 constituent 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.

17384 Introduction : L'endomètre est le tissu qui tapisse la cavité de l'utérus. Sous l'effet des hormones (œstrogènes), au cours des cycles menstruels, l'endomètre s'épaissit en vue d'accueillir un potentiel embryon, et s'il n'y a pas fécondation, se désagrège et saigne. Ce sont les menstruations/règles.

Chez quasiment toutes les femmes, des cellules vont remonter et migrer via les trompes et se disperser dans la partie basse de l'abdomen (cavité péritonéale). C'est la théorie du reflux menstruel. Mais le système immunitaire s'organise pour détruire ces cellules qui ne se trouvent pas là où elles devraient.

Or 10 % des femmes développent une pathologie appelée endométriose. Celle-ci se caractérise par le développement du tissu endométrial en dehors de l'utérus. Les cellules de l'endomètre, qui ne sont pas détruites, se greffent sur d'autres organes, provoquant alors des lésions, des adhérences et des kystes ovariens, (endométriomes). C'est ce qui définit l'endométriose.

Cette « colonisation », si elle a principalement lieu sur les organes génitaux et le péritoine, peut fréquemment s'étendre aux appareils urinaire, digestif, et plus rarement pulmonaire (diaphragme). Il a même été rapporté de très rares cas d'endométriose au niveau du cerveau.

Il existe 3 types de lésions d'endométriose : l'endométriose superficielle (ou péritonéale), l'endométriose ovarienne (kystes) et l'endométriose profonde (sous le péritoine).

Un tiers des cas d'endométriose sont superficielles et ne se développe pas, voire régresse grâce au traitement (médical ou chirurgical) ou de façon spontanée. Cependant, certaines endométrioses vont évoluer vers des formes sévères, d'où l'intérêt de poser un diagnostic le plus précocement possible.

A ce jour, il n'existe pas de traitements définitifs de l'endométriose, et seuls l'hormonothérapie (privation d'hormone ou cure de ménopause artificielle) et/ou la chirurgie peuvent endiguer l'évolution de cette maladie.

Objectif du projet : Afin d'évaluer de nouveaux traitements, il est proposé dans ce projet de développer un modèle induit d'endométriose chez la souris. Ces évaluations se feront par le suivi de l'évolution sanitaire des animaux au cours de l'étude, l'analyse macroscopique et/ou histologique des tissus endommagés ou bien encore, la mesure de marqueurs de l'inflammation.

Avantages escomptés: Ce projet permettra de documenter l'efficacité de composés en développement pour le traitement de l'endométriose.

Dommages escomptés: L'induction de lésions de type endométriosiques dans l'organisme peut entraîner un état de stress et/ou de douleur chez l'animal. Le bien-être des animaux sera attentivement suivi durant toute la durée de la phase expérimentale grâce à des fiches d'observation/points limites adaptés. Des procédures de prise en charge adaptées seront également mises en place. Des points limites préalablement définis 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.

Méthodes alternatives (principe de remplacement):

A ce jour, il n'existe pas de méthode *in vitro* satisfaisante scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu pour simuler cette pathologie.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

Choix des espèces / Méthode de raffinement : L'espèce souris est 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 15 animaux par groupe sera nécessaire pour permettre une analyse robuste des résultats générés.

Sur une période de 5 ans, un maximum de 2885 animaux (dont 260 surnuméraires) sera utilisé pour la réalisation de la procédure expérimentale, la formation et/ou le maintien des compétences techniques. Des études statistiques seront réalisées après chaque étude ceci afin de nous permettre de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental, tout en gardant la puissance et la robustesse du modèle.

Conditions d'hébergement et de soins:

Les conditions d'hébergement et de soins utilisés ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations françaises et européennes. Les animaux seront hébergés

préférentiellement en cage collectives. Cependant si un hébergement individuel s'avérait nécessaire (condition de traitement, agressivité entre congénères, mise en isolement pour suivre le comportement...), les cages utilisées permettraient un contact visuel, auditif et olfactif entre les animaux.

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 tunnels). De la musique peut également être diffusée dans l'enceinte d'hébergement. La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue et mise à jour.

Avant chaque étude, une période d'acclimatation, d'au moins 5 jours, sera appliquée.

Le contrôle des animaux sera assuré quotidiennement et des points limites 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.

17385 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 dû 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 (38%) 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 2 mois, que le fait de compléter la nourriture par de la poudre de nacre pendant 1 mois, juste après ovariectomie, réduisait la perte osseuse.

Une première étude a montré chez des rates âgées de 4 mois qu'une supplémentation nutritionnelle en nacre juste après ovariectomie pendant 4 semaines limite la perte osseuse de manière plus importante qu'une supplémentation nutritionnelle en carbonate de calcium pur.

Nous utiliserons comme modèle animal la rate ovariectomisée reproduisant les changements osseux rapportés dans l'ostéoporose chez la femme après la ménopause, conséquence de la carence en œstrogène. Le modèle d'ovariectomie chez le rat femelle (rate) est un modèle recommandé et un test pertinent et incontournable pour tester l'efficacité d'un produit sur la perte osseuse induite par la ménopause.

Immédiatement après la chirurgie, la supplémentation en poudre de nacre dans l'alimentation quotidienne commencera pour une période de 90 jours.

Le laboratoire a déjà réalisé des projets incluant le modèle de rates ovariectomisées, il a également publié sur les modifications du remodelage vasculaire accompagnant ou anticipant le remodelage osseux.

Dans le cadre de cette étude nous aborderons deux aspects :

- L'analyse de l'efficacité de la nacre sur la microstructure de l'os, les dynamiques osseuses de formation/résorption de l'os cortical et les activités cellulaires de l'os trabéculaire.
- En lien avec les pharmacologues, le suivi pharmacologique des métabolites de la nacre par spectrométrie de masse dans le sang et les effets secondaires éventuels sur les autres tissus (anapathologie).

Afin de mener à bien ce projet, 52 rats femelles matures (rates) sur le plan squelettique âgées de 16 semaines seront nécessaires. Cette étude comprendra un groupe de 4 animaux (nourriture standard) utilisé pour l'entraînement à la chirurgie (2 animaux "Sham" avec chirurgie mais non ovariectomisés et

2 animaux "OVX" avec chirurgie et ovariectomisés) et 4 groupes de 12 animaux (Sham, OVX, OVX carbonate de calcium pure, OVX 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... Le poids corporel sera mesuré tous les deux jours à heure fixe. 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.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets de 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 des sécrétions hormonales (œstrogènes), influencent la cinétique de perte osseuse. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent d'ovariectomie chez la rate par l'intérêt de la perte osseuse induite. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos 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, tunnel transparent rouge, 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.

17386 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique musculaire liée au chromosome X et due à des défauts génétiques de la dystrophine, une protéine du muscle strié, tissu comprenant les muscles squelettiques et cardiaques. La DMD touche environ 1 garçon sur 3500. Elle se manifeste dès 2-3 ans par une faiblesse musculaire progressive puis une perte de la marche le plus souvent avant 12 ans. L'atteinte des muscles cardio-respiratoires est la cause majeure de mortalité et morbidité dans la DMD. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour pour cette maladie.

La dystrophine est une protéine importante pour la résistance des muscles aux dommages liées aux contractions musculaires. Le défaut génétique rend donc les fibres musculaires fragiles ce qui entraînent leur dégénérescence. Le muscle squelettique a une capacité de régénération qui lui est conférée par l'existence de cellules dites satellites, qui sont des cellules souches localisées en surface des fibres musculaires et qui, lors d'une lésion musculaire, vont proliférer et fusionner en nouvelles fibres musculaires pour remplacer les fibres lésées. Dans la myopathie de Duchenne, cette efficacité de régénération s'épuise au fur et à mesure, et le tissu musculaire dégénère donc progressivement. Cette efficacité décroissante conduit à une atrophie musculaire et donc à un handicap fonctionnel. Il faut noter que certaines espèces comme la souris ont une capacité de régénération plus importante que chez l'homme, ce qui peut expliquer que les modèles murins de la myopathie de Duchenne présentent une atteinte beaucoup moins importante que chez les patients DMD.

Le but de l'étude est de vérifier l'effet thérapeutique de stratégies de thérapie génique associées ou non à un traitement augmentant la régénération sur la capacité de régénération musculaire dans des modèles de souris de la myopathie de Duchenne appelé mdx. Afin d'obtenir une régénération simultanée de toutes les fibres, il est nécessaire de réaliser une induction supplémentaire de cycles de dégénérescence /régénération par une stratégie expérimentale utilisant un traitement biochimique

(dérivé de venin de serpent), conduisant à la lyse des membranes des fibres musculaires, le forçant ainsi à se régénérer. Cette lyse n'entraîne pas de phénotype dommageable.

Dans cette étude, nous utiliserons comme traitement à visée thérapeutique i) des gènes portés par des vecteurs viraux et ii) des molécules pharmacologiques qui seront injectés dans des souris modèles de la dystrophie de Duchenne. L'effet bénéfique chez les souris mdx recevant un traitement thérapeutique correspondra à une performance musculaire restaurée et à moins de dommages aux fibres musculaires. Ces effets seront mesurés par des tests fonctionnels et des analyses histologiques.

Remplacement : Ce projet a recours aux modèles animaux pour les raisons principales suivantes : on ne sait pas reproduire *in vitro* tous les composants impliqués dans la régénération musculaire dans un contexte normal ou pathologique, ni modéliser aujourd'hui la distribution d'un traitement de thérapie génique 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.

Réduction : Les protocoles d'études seront réalisés en incorporant le juste nombre d'animaux nécessaire pour pouvoir tirer des conclusions, ce nombre est défini par des tests statistiques.

En particulier, les conditions optimales de régénération sur le modèle murin WT afin de définir la cinétique de la régénération d'un muscle WT après une lésion sont obtenus sous couvert d'une autre autorisation de projet (Apafis#12242).

Raffinement : Nous utiliserons un modèle de la myopathie de Duchenne pour lequel la cinétique de régénération est bien connue. Des mesures adaptées de la gestion de la douleur que les animaux pourraient ressentir ainsi que des mesures adaptées pour réduire le stress seront mises en place.

Dans ce projet, nous estimons que 400 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.

17387 La pollution lumineuse nocturne, due à l'urbanisation et au développement des infrastructures de transports, a augmenté de façon spectaculaire dans de nombreuses parties du monde. Du fait de l'urbanisation croissante, de nombreuses zones humides, ayant une importance écologique considérable notamment en tant que réservoir de biodiversité, se retrouvent dans des aires urbaines et péri-urbaines exposées à cette pollution. Le crapaud commun, *Bufo bufo*, est une espèce d'amphibien largement répandue en Europe que l'on retrouve régulièrement dans les zones humides soumises à la lumière artificielle nocturne. Les têtards ont une vie exclusivement aquatique jusqu'à la métamorphose qui a lieu après deux à trois mois de développement. Les têtards qui éclosent dans des zones humides soumises à de la pollution lumineuse nocturne, même s'ils ont la possibilité de se cacher partiellement dans la végétation, vont donc être exposés à ce stress tout le long de leur développement. Plusieurs études menées sur différents modèles humain et animaux montrent que la lumière artificielle nocturne inhibe la synthèse nocturne de mélatonine, hormone impliquée dans de très nombreuses fonctions biologiques telles que la réparation cellulaire, l'immunité, la gestion du stress oxydant, le métabolisme énergétique et la régulation de l'alimentation, la synthèse des hormones sexuelles. Chez l'homme, la pollution lumineuse est associée à une prévalence accrue de pathologies telles que l'obésité, le diabète de type 2, l'hypertension, les désordres affectifs ou certains cancers.

La majorité de ces altérations physiologiques pourraient être liées à une perturbation de la rythmicité d'expression de gènes.

Afin d'acquérir des connaissances sur l'impact de la pollution lumineuse à l'échelle moléculaire, nous allons travailler directement sur les gènes afin de pouvoir comparer les profils d'expression génique de têtards soumis à différents niveaux de pollution lumineuse et de têtards témoin.

Dans cette expérimentation, un fragment de 5 pontes permettant l'éclosion de 30 têtards de *Bufo bufo* seront prélevés sur le terrain dans une zone indemne de pollution lumineuse au moment de la période de reproduction (fin février – début avril, selon les conditions météorologiques) et maintenus, proche du lieu de capture, dans une animalerie ectotherme. Dès l'éclosion, les 30 têtards seront répartis dans

six aquariums (5 têtards issu de pontes différentes/aquarium) contenant 7.5 L d'eau déchlorée et oxygénée en continu.

Les aquariums seront exposés à l'un des trois traitements lumineux nocturnes (2 aquariums/traitement) : éclairage témoin (12h jours/12 heures de nuit), pollution lumineuse faible correspondant au halo lumineux des grandes villes (12h jours/12 heures à 0.1 lux) et pollution lumineuse forte correspondant à une zone humique dans une aire peri-urbaine (12h jours/12 heures à 5 lux). Durant l'expérimentation, dès que les juvéniles auront atteint un stade de développement leur permettant de s'alimenter, ils seront nourris ad libitum tous les jours avec de la salade verte biologique cuite et nous nous assurerons qu'ils s'alimentent correctement (disparition totale de la nourriture dans l'aquarium en 24 h). Ce mode d'hébergement, couramment utilisé dans notre équipe, permet de limiter le stress lié à la captivité.

Après 1 mois d'expérimentation, les 10 têtards de chaque traitement lumineux seront prélevés en milieu de nuit (01h) et euthanasiés.

Le prélèvement des fragments de ponte sur le terrain sera pratiqué de manière à avoir une éclosion la plus proche de 30 têtards au total. Néanmoins, la découpe des œufs sur le terrain implique que nous aurons une éclosion de quelques têtards surnuméraires (environ 20) qui seront relâchés conformément à l'autorisation de la DREAL, sur le lieu de capture à l'état métamorphe (crapelet). Ils seront donc délicatement déposés sur la berge proche de l'eau.

L'impact de la pollution lumineuse sera ensuite évalué en comparant le niveau d'expression des gènes entre les têtards témoin et ceux soumis à la pollution lumineuse.

Notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, réduction et raffinement :

1) Remplacement : L'expression génique est un mécanisme moléculaire impliquant des phénomènes de régulation complexes, non modélisables, car s'appliquant à des organismes vivants dans leur intégrité et leur complexité. Ainsi, aucune expérience *in silico* ou *in vitro* ne permet d'accéder à ce type de données. Il n'existe donc aucune méthode alternative à la réalisation de ce projet. De fait, l'utilisation du modèle animal est incontournable.

2) Réduction : Toutes les procédures expérimentales qui seront mises en œuvre ont été optimisées statistiquement, de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés et prélevés dans la nature tout en obtenant des résultats significatifs (10 têtards par traitement). De plus, l'approche d'analyse moléculaire choisie, est une approche globale qui permet d'évaluer l'expression de l'ensemble des gènes présents dans l'échantillon et ainsi permettre d'explorer les différentes familles de gènes affectées par le traitement lumineux. La quantité de matériel génétique ARN extraite par têtard (~150 µg) étant largement supérieure à la quantité nécessaire pour réaliser les analyses transcriptome (750 ng/têtards), une fois purifié ce matériel génétique supplémentaire sera conservé au congélateur -80° afin de pouvoir réaliser par la suite et, en fonction des résultats obtenus dans cette étude, des analyses complémentaires ciblées sur des fonctions biologiques précise. Ceci permettra de fait de rentabiliser l'ensemble des échantillons pendant plusieurs années.

3) Raffinement : Le bien-être des animaux est une condition sine qua non de chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'hébergement, couramment utilisées et maîtrisées dans notre équipe, sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse que pourraient ressentir les animaux. En particulier la température de l'eau, source de stress importante chez ces animaux sera contrôlés deux fois par jours. Par ailleurs, le bien-être animal sera assuré par la présence de personnel compétent 7J/7J pour l'observation et le soin des animaux.

17388 Le terme général de cancer s'applique à un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'un des traits caractéristiques du cancer est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent envahir différentes parties de l'organisme et essaimer dans d'autres organes. En 2018, l'OMS recensait plus de 8,8 millions de morts par cancer dans le monde. Parmi les plus meurtriers se trouve le cancer du poumon (1er rang, 1,7 millions de morts), colorectal (2ème, 880.000), du foie (3ème, 781.000), du pancréas (7ème, 432.000) du rein (16ème, 175.000) et de la peau ou mélanome (22ème, 60.000). Ces cancers se développent à partir d'organes partageant la particularité d'exprimer une protéine particulière appelée Claudine-1 qui participe à l'ancrage des cellules les unes avec les autres. Depuis plusieurs années cette protéine est vue comme une cible thérapeutique pour

les maladies du foie notamment le carcinome hépatocellulaire (CHC), une forme de cancer du foie. Il a été montré que le ciblage de la Claudine-1 par un anticorps spécifique de cette protéine pouvait efficacement prévenir le développement du CHC. Plus récemment, cette approche thérapeutique a été appliquée aux cancers précédemment cités *in vitro* et a montré un effet important sur la croissance des cellules tumorales. Afin de confirmer ces résultats *in vivo* cette approche sera testée dans un modèle de souris greffées avec des cellules tumorales humaines issues des différents cancers cités ci-dessus (poumon, colorectal, foie, pancréas, rein, peau).

Cette demande d'autorisation concerne donc l'utilisation de souris dépourvues de système immunitaire et greffées avec des cellules tumorales. Après validation de la prise de greffe et de la croissance tumorale, les souris seront traitées avec une injection d'anticorps spécifique de la Claudine-1 afin de vérifier l'efficacité de cette approche sur la croissance tumorale des cancers précédemment cités. L'approche *in vivo* est indispensable afin de tester l'efficacité de cet anticorps sur des tumeurs vascularisées humaines, impossible à reproduire *in vitro*.

Le nombre d'animaux nécessaire est estimé à 720. L'effet de l'anticorps sera évalué sur au minimum 2 tumeurs différentes pour chaque cancer.

Remplacer : une majorité des expériences ont été menées en amont, *in vitro* sur des lignées cellulaires cultivées en 3 dimensions afin de nous assurer de la réelle nécessité de poursuivre sur ces modèles animaux greffés avec des cellules humaines.

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. Le nombre d'animaux nécessaire dépend grandement du type de cellules greffées et de leur vitesse de croissance.

Raffiner : le protocole expérimental est planifié en amont, l'environnement des animaux est enrichi avec des tiges de coton pour permettre la nidification et de briques de tremble à ronger, les animaux sont conservés à 3 minimum par cage pour éviter l'effet de l'animal isolé, 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). Des points limites suffisamment prédictifs et précoces ont été établis afin d'interrompre la procédure et de soustraire les animaux à toute souffrance inutile.

17389 Dans le cerveau, les neurones communiquent entre eux via des signaux électriques dont la bonne transmission dépend d'un compartiment spécifique du neurone appelé : le segment initial de l'axone (AIS). Il est maintenant connu qu'une défaillance de l'AIS peut entraîner des troubles psychiatriques majeurs comme le trouble bipolaire, les troubles autistiques ou la schizophrénie.

Notre objectif pour ce projet est de déterminer quels composants de l'AIS sont indispensables au bon développement du cortex cérébral. Cette étude sera réalisée sur 5 ans chez le rat.

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, notamment tous les outils utilisés dans ce projet ont été validés préalablement sur cellules en culture. Cependant, il est important, une fois nos hypothèses testées in-vitro, de vérifier leur véracité dans le cerveau de modèles animaux.

Raffiner : Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, une anesthésie générale, un traitement analgésique pré/post-opératoire, un suivi post-opératoire 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 avons évalué le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 265 rats sur 5 ans.

17390 Les plaquettes sanguines jouent un rôle clef dans l'arrêt du saignement. Suite à une lésion vasculaire elles adhèrent à la paroi lésée pour former un clou hémostatique qui stoppe les saignements. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus ont été clairement identifiés.

Les plaquettes participent également au maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation dans des organes tels que la peau, le poumon ou le cerveau. Ceci a été démontré par le fait que l'absence de plaquettes (thrombopénie) induit des saignements au niveau d'un site présentant une inflammation. A ce jour, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent obscurs et il a été proposé ces mécanismes différents de ceux de l'hémostase primaire.

Comprendre le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire et dans l'arrêt du saignement au niveau du site inflammatoire peut avoir des applications pour soigner des patients qui présentent des saignements lors d'une inflammation.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance d'une classe de récepteurs plaquettaire appelés les intégrines qui sont impliqués dans l'adhérence et l'activation des plaquettes. Pour cela des animaux seront soumis à un modèle d'inflammation cutanée induite par une réaction antigène – anticorps et à un modèle d'inflammation cérébrale induite par ischémie – reperfusion d'une artère cérébrale, deux modèles générant une inflammation locale.

Remplacement : Le but de ce projet est d'évaluer le rôle des intégrines plaquettaire dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors de réactions inflammatoires.

Le phénomène d'Arthus est une réaction d'hypersensibilité concernant 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.

De la même façon l'accident vasculaire cérébral est un processus particulièrement complexe faisant intervenir plusieurs types cellulaires ainsi que des conditions hémodynamiques, il nous semble impossible de substituer la souris par des modèles *in vitro*.

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 : 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 296 souris.

17391 En France, la mise à la reproduction de juments par transfert d'embryon est en constante augmentation depuis plusieurs années. Cette technique nécessite une synchronisation des cycles entre la jument donneuse et la jument receveuse ce qui impose de disposer d'un troupeau de receveuses conséquent et engendre une charge de travail très importante pour un centre. A l'heure actuelle, il est possible de réfrigérer des embryons, ce qui permet leur transport du centre de collecte vers un centre de transfert, dans un délai de 24 heures maximum. A contrario, la vitrification des embryons permet de différer dans le temps, sans notion de délai, et dans l'espace la collecte de l'embryon et son transfert dans une receveuse. Ainsi, les enjeux de la vitrification pour la filière équine sont multiples. Cela permet de réduire la taille des troupeaux de receveuses et donc de diminuer les coûts d'entretien pour un centre de transfert, tout en améliorant le bien-être des animaux vivants ensemble. Un propriétaire d'une jeune

jument à fort potentiel génétique peut faire vitrifier des embryons avant le début de carrière sportive de sa jument. Pour une jument déjà en compétition, la vitrification de ses embryons peut être réalisée à l'automne, à la suite des compétitions, sans besoin de receveuse disponible à cette période moins propice de l'année. Un autre intérêt de la vitrification d'embryons, et non des moindres, est la possibilité de transporter des embryons à l'international. Enfin, la vitrification des embryons est un enjeu important pour la cryobanque nationale, afin de conserver des races équines et asines en voie de disparition.

Depuis 2011, la vitrification après réduction préalable d'au moins 70% du volume blastocoelique par micro-aspiration à l'aide d'une pipette actionnée par un micro manipulateur est devenue la technique de choix pour cryoconserver les embryons équins de diamètre supérieur à 300µm. En France, les 1ers poulains issus de transfert d'embryons biopsiés et cryoconservés sont nés en 2014. Si cette technique est réalisée par une personne expérimentée, 50% de taux de gestation peuvent être obtenus après transfert. Par contre, avec une personne moins expérimentée, les résultats de gestation varient entre 18% au début des essais et 39% après avoir manipuler une trentaine d'embryons. Cette réduction du volume blastocoelique, partielle ou totale, par aspiration à l'aide de pipettes reliées à un micromanipulateur est donc une technique qui nécessite un long apprentissage et un matériel coûteux (microscope équipé d'un micro manipulateur). C'est pourquoi il a été testé récemment à l'INRA une nouvelle technique pour tenter de rendre plus facile l'accès à la vitrification des embryons équins par des techniciens de centre de transfert d'embryons. Cette technique consiste à aspirer totalement à main levée le liquide blastocoelique après introduction d'une micropipette à travers la capsule. Dans cette étude, l'aspiration à main levée a été réalisée par une personne expérimentée à la micromanipulation. Les 10 embryons vitrifiés ont été mis en culture *in vitro* après décongélation. Tous ont repris leur développement. Pour garantir une sécurité sanitaire lors du stockage d'embryons vitrifiés, l'utilisation de paillettes haute sécurité a été récemment testée et validée à la jumenterie du Pin. Ces paillettes sont fermées par soudure avant stockage dans l'azote liquide, contrairement aux paillettes Open Pull Straw, habituellement utilisées, qui sont stockées ouvertes. Le milieu de vitrification couramment utilisé contient un seul cryoprotecteur, l'éthylène glycol, à forte concentration (7M) ce qui représente une toxicité non négligeable pour l'embryon. Il est montré que l'utilisation de 2 cryoprotecteurs permettait une bonne vitrification tout en réduisant la toxicité de chacun, puisque utilisés à de moins fortes concentrations.

L'objectif de notre projet est de pouvoir valider *in vivo*, après transfert dans une receveuse, un protocole optimal pour la vitrification des embryons équins et asins tout en garantissant une sécurité sanitaire pour le stockage de ces embryons dans les cuves d'azote liquide. L'objectif est de pouvoir transférer 20 embryons préalablement micromanipulés et aspirés avant vitrification.

Remplacer : l'étude s'intéresse à la vitrification des embryons équins. La filière est en attente d'une technique fiable qui donne de bons taux de réussite après décongélation. Nous ne pouvons donc pas remplacer le modèle animal pour faire nos tests de survie *in vivo*.

Réduire : Le transfert de 20 embryons permettra d'avoir des résultats fiables de la technique. Un taux de réussite de 50% est recherché. Transférer moins de 20 embryons est difficilement envisageable.

Raffiner : L'étude est menée dans des conditions d'élevage, les animaux sont utilisés un minimum de fois. 30 juments seront nécessaires au protocole. Le taux de collecte moyen des embryons est de 50%. Nous utiliserons donc en moyenne 1,5 cycles par jument pour obtenir nos 20 embryons.

Par ailleurs, les animaux sont gérés par du personnel qualifié dans des installations appropriées pour la mise en œuvre des collectes et transferts.

17392 La stéatohépatite est une maladie du foie liée à l'obésité, dans laquelle le foie présente une adiposité excessive à l'origine d'une inflammation. Cet état peut devenir irréversible et évoluer vers une cirrhose ou un cancer. Il s'agit de la cause d'hépatite la plus répandue et son origine principale est une alimentation mal équilibrée, riche en graisse et en sucre. Il existe des différences liées au sexe dans l'apparition et l'évolution de ces maladies qui sont encore mal connues. Nous proposons d'étudier le rôle d'une protéine impliquée dans le métabolisme des hormones sexuelles en utilisant un modèle de souris génétiquement modifié n'exprimant pas cette protéine dans le foie afin d'améliorer les connaissances dans ce domaine. L'interaction entre les hormones sexuelles, le foie et le tissu adipeux

nécessite d'utiliser un animal vivant, dans sa globalité. Pour évaluer l'importance des trois facteurs d'intérêt dans notre expérience (le genre, le transgène et le régime), il est nécessaire d'utiliser des animaux mâles et femelles, transgéniques et leur contrôle, ainsi qu'un régime contrôle pour le comparer au régime gras et sucré, induisant la maladie. Ainsi, le projet porte sur l'étude du rôle physiologique et physiopathologique hépatique de cette protéine dans laquelle 1724 souris seront utilisées, réparties en groupe de 10, un nombre nécessaire pour obtenir des résultats interprétables de façon fiable. Des mâles et des femelles, transgéniques et contrôle, seront hébergées dans des locaux d'animalerie appropriés, leur apportant les meilleures conditions de bien-être et de santé et recevront un régime riche en graisses et en sucre, dit "Western Diet" pendant 30 semaines, en comparaison d'animaux sous un régime standard pour souris de laboratoire. Les contraintes éventuelles subies par les animaux au cours des différentes procédures seront prises en charge par l'administration, notamment, d'anesthésiants et/ou d'analgésiques. Les animaux seront suivis de façon bi-hebdomadaire par l'expérimentateur et quotidiennement par l'animalier. Un animal dont l'état est préoccupant et présentant au moins un des facteurs répertoriés dans les procédures détaillées ci-après (3.4.13) serait euthanasié. En fin d'expérience, les animaux seront euthanasiés afin de prélever du sang et des organes d'intérêt (dont le sang et le foie) pour des explorations moléculaires et biochimiques.

17393 La surdité neurosensorielle, dite de perception est liée dans la majorité des cas à la perte des cellules ciliées de l'oreille interne. Chez l'homme, et plus généralement chez le mammifère, ces cellules ne peuvent pas se renouveler, ce qui est différent chez d'autres espèces comme les poissons ou les oiseaux.

Une des hypothèses expliquant cette différence est liée à une production différente de la protéine p27 dans ces espèces.

A travers ce projet, nous voulons savoir dans un modèle animal de rat si l'arrêt temporaire de l'expression de p27 permet une régénération des cellules ciliées de l'oreille interne. Nous avons déjà mis au point chez la rat un modèle *in vitro* permettant de penser que cette approche pourrait marcher chez l'animal adulte et à termes chez l'homme.

Les expériences *in vitro* nous permettront 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 chirurgie de l'oreille chez l'homme. L'intervention chirurgicale nécessaire à l'implantation d'une pompe et à l'injection des produits permettant de bloquer de manière temporaire l'expression de p27 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 30 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. Les cellules nouvellement produites seront recherchées dans les échantillons pour évaluer l'efficacité de la procédure.

17394 L'insuffisance cardiaque (IC), incapacité progressive du cœur à fournir un débit sanguin nécessaire aux besoins métaboliques d'un individu dans la vie courante, est la seconde cause de mortalité dans les pays occidentaux. La réponse définitive au problème d'insuffisance cardiaque est le rétablissement du débit cardiaque, ce qui n'est, à ce jour, pas pris en charge par la médication, et les dispositifs d'assistance ventriculaire peu efficaces et trop coûteux.

Le projet est d'expérimenter un nouveau type de mini-pompe cardiaque dénommée « ICOMS » (Implantable Cardiac Output Management System) synchronisée avec le cycle cardiaque, de petite taille et sans câble externe.

Afin de tester ce dispositif, l'utilisation d'animaux est indispensable. En effet il n'est pas possible de remplacer les essais in-vivo pour reproduire la physiologie complexe d'un corps entier.

Il est nécessaire de démontrer son innocuité ainsi que son efficacité avant que le procédé ne puisse être appliqué chez l'homme en tant que traitement reconnu.

Des essais sans réveil de l'animal ont été réalisés et ont permis de confirmer un certain nombre de critères prometteurs liés à des paramètres sanguins.

Le modèle animal choisi est le mouton qui permet de reproduire des résultats qui seront applicables chez l'Homme. Le remplacement de l'utilisation d'animaux ne peut pas être envisagé dans le cadre de notre étude car il n'est pas possible de remplacer les essais in-vivo pour reproduire la physiologie complexe d'un corps entier. Le nombre d'animaux est de 30 ce qui est le minimum pour réaliser cette étude. Le nombre défini est réduit au minimum pour pouvoir tester l'ensemble des paramètres permettant de répondre aux objectifs. Tout au long de la réalisation de l'expérimentation, toutes les mesures seront prises pour répondre au bien-être des animaux par des mesures de raffinement : lors de la phase de suivi des animaux, ceux-ci seront hébergés en groupes sociaux avec à disposition des mesures d'enrichissement (paille, foin...). Les animaux seront surveillés plusieurs fois par jour. Les soigneurs seront vigilants à la prise alimentaire, au comportement et à la locomotion des animaux. Un animal anorexique, prostré recevra l'administration d'analgésique. Sans réponse physiologique satisfaisante, il sera procédé à la mise à mort suivie de l'observation du site lésionnel.

17395 La réhabilitation rapide après chirurgie programmée (enhanced rehabilitation after surgery ou ERAS) s'appuie sur une prise en charge globale du patient de chirurgie visant à diminuer la morbidité et améliorer la récupération en période postopératoire. En effet, toute procédure chirurgicale, à des degrés variables en fonction de sa sévérité, est à l'origine de réponses hormonale et inflammatoire correspondant à la lutte de l'organisme contre le phénomène agressif. Les complications et le délai de retour à l'homéostasie seront très largement dépendants de cette sévérité. Si cette dernière est en fonction de l'acte chirurgical proprement dit, les conditions de sa réalisation jouent un rôle important comme le montre par exemple la récupération plus rapide des patients après coelioscopie par rapport à la laparotomie. L'approche ERAS vise à identifier et à prévenir tous les facteurs d'aggravation qui pourraient ralentir la récupération postopératoire. Elle comprend en particulier l'optimisation de l'anesthésie et de l'analgésie, l'utilisation d'anti-inflammatoires et la prise en charge nutritionnelle. Concernant ce dernier aspect, la limitation au maximum du jeûne préopératoire, en encourageant les patients à consommer des boissons glucidiques jusqu'à deux heures avant l'intervention, permettrait de réduire l'insulino-résistance et l'inflammation postopératoires, deux phénomènes qui impactent la synthèse protéique et donc les processus de réparation tissulaire.

L'indication du jeûne préopératoire repose sur la crainte des régurgitations et du risque éventuellement fatal d'inhalation du contenu gastrique. Or, le jeûne préopératoire associé au stress chirurgical entraîne une diminution de la sensibilité des muscles et du foie à l'action de l'insuline et serait responsable d'une morbidité accrue et d'un allongement de la durée d'hospitalisation. L'apport de boissons claires permet, sans induire de risque d'inhalation, d'éviter l'état de jeûne. Toutefois, la composition de ces boissons a été établie de façon empirique en se focalisant sur le seul apport glucidique sur la base du rôle du glucose dans la sécrétion et l'action de l'insuline. Or, d'autres nutriments, en particulier des acides aminés tels que la glutamine et la citrulline sont connus pour leur action sur l'état inflammatoire et le turn-over protéique. Dans la première partie de notre projet, nous avons étudié l'effet d'une solution glucidique (ERAS), associée ou non à la glutamine. Nous avons démontré un effet positif de la solution ERAS sur la synthèse protéique, mais cet effet n'augmente pas en l'associant à la glutamine. Dans cette deuxième partie du projet nous voulons tester l'effet de la citrulline sur la récupération postopératoire. La base rationnelle de cette nouvelle étude est que la citrulline a une puissante action sur la synthèse protéique. De plus, des données récentes *in vitro* indiquent que la citrulline possède des effets anti-inflammatoires sur des macrophages en culture.

Notre hypothèse de travail est que l'apport préopératoire de la citrulline, en plus d'une solution glucidique, devrait permettre d'optimiser l'effet de ce type de solution sur la réponse inflammatoire induite par le stress chirurgical.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'effet de l'administration préopératoire d'une solution glucidique additionnée ou non de citrulline. Les critères de jugement nécessaires à l'exploration des mécanismes du stress chirurgical demandent des prélèvements tissulaires multiples : cette étude n'est donc pas envisageable chez l'être humain. S'agissant d'une étude métabolique et nutritionnelle, cette évaluation ne peut être réalisée *in vitro* ou *ex vivo*.

Nous comparerons les résultats à ceux obtenus chez des animaux opérés à jeun et complétés par la solution glucidique et un mélange d'acides aminés non essentiels (NEAA) afin que les deux groupes reçoivent des apports iso-azotés. 90 animaux seront utilisés dans ce projet, au final chaque groupe sera constitué de 10 animaux. Cette étude a été configurée en respectant la règle des 3R : 1) Remplacer : les animaux ne peuvent être remplacés par des cellules ou autre moyen *in vitro*, afin de comprendre le mécanisme d'action de ces solutions chez l'Homme. 2) Réduire: le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum, 90 rats au total sont prévus pour cette procédure dont la durée sera de 2 ans. 3) Le raffinement est appliqué dans ce projet en réduisant toute sorte de stress extérieur au protocole, les animaux seront opérés et sacrifiés dans une autre pièce, loin des animaux qui ne le sont pas, en plus de tous les moyens utilisés comme analgésiques et anesthésiants pour réduire toute forme de souffrance physique des animaux.

17396 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 après l'étude pilote intitulée « Développement de nouveaux biomarqueurs pour l'imagerie cérébrale en IRM haut champ chez le rat et la souris ». L'objectif principal de ce travail est d'améliorer les connaissances des processus physiopathologiques de la survenue et de l'évolution de la démyélinisation/remyélinisation au sein du système nerveux central. Nous souhaitons décrire les changements longitudinaux des lésions démyélinisantes de façon mensuelle sur une période de suivi de 6 mois, en utilisant un modèle animal de démyélinisation focale (30 rats).

La procédure décrit le suivi longitudinal sur le rat pendant 6 mois, avec sacrifice de 5 animaux tous les mois afin de réaliser des contre-mesures *ex vivo*, de nos mesures *in vivo*, par analyse histopathologique et autoradiographie.

Application des 3R :

Remplacer Cette étude porte sur une expérimentation sur rats qui assure en IRM une amplitude de signal suffisante (qui est proportionnelle à la zone observée, le rat présente un volume cérébral significativement plus grand que la souris) et pour lesquels une étude pilote a été menée et les techniques et protocole d'imagerie déterminés. Le passage à la souris se fera dans une deuxième phase 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 : Notre étude nécessite des contre mesures *ex vivo* par analyse histopathologique, nous avons réduit le suivi des modifications à une mesure par mois, et avons défini une contre mesure portant sur 5 animaux sacrifiés par mois, ce qui donne, pour 6 mois de suivi, 30 rats modèles à préparer. Aussi, la démyélinisation induite étant focale, une contre mesure de "tissu sain" *in vivo* dans l'hémisphère contralatérale pourra être réalisée, et nous n'avons pas envisagé d'avoir un groupe d'animaux sains de contrôle pour ce suivi.

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.

17397 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) concerne plus d'un million de personnes en France, elle est ainsi la première cause de cécité chez les plus de 50 ans. La forme humide est caractérisée par des vaisseaux anormaux sous-rétiniens (néovaisseaux), des hémorragies rétiniennes et un œdème maculaire. Elle est la moins fréquente mais son évolution peut être particulièrement rapide et invalidante.

Les traitements actuels (anti-VEGF) sont administrés par injection intra-vitréenne tous les 1-2 mois afin de maintenir des niveaux efficaces du médicament dans l'œil. Néanmoins, le poids de ce type de

traitement pour les patients, leurs familles et les organismes de soins est tel que la fréquence des injections nécessaires pour contrôler efficacement la maladie n'est souvent pas respectée.

La recherche se tourne donc actuellement vers des solutions thérapeutiques à longue durée d'action, additives et/ou alternatives aux molécules anti-VEGF.

La thérapie génique est l'une des stratégies possibles pour assurer une production continue et durable d'une protéine thérapeutique et s'affranchir des traitements répétés. Notre laboratoire a développé une thérapie non virale par électrotransfert dans le muscle ciliaire de plasmide contenant la séquence codant jusqu'à deux protéines thérapeutiques. La transduction des cellules du muscle ciliaire permet une expression localisée et durable des protéines et permettrait ainsi d'espacer les injections chez les patients.

L'objectif de notre projet est donc d'évaluer les effets anti-angiogénique et anti-fibrotique de l'administration du plasmide codant la Protéine 9 (anti-VEGF, nom confidentiel) et la Protéine 12 (nom confidentiel), combinant ainsi des propriétés anti-fibrotique et anti-angiogénique.

L'ensemble du projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation de 552 rats.

Ce projet a été développé en respectant la règle des 3R. Les rats seront stabulés par 2 par cage avec un environnement enrichi afin d'éviter le stress. Une première partie du projet aura pour objectif de sélectionner la construction plasmidique permettant l'expression optimale des protéines cibles. Le modèle de néovascularisation choroïdienne (CNV) qui sera ensuite utilisé est induit par photo-coagulation laser. Il est le seul modèle expérimental permettant de démontrer l'efficacité de cette technologie et il n'existe pas de modèle *in vitro* de DMLA exsudative. Par ailleurs, avoir recours à un œil sur animal vivant est indispensable pour montrer que, via cette technologie, la protéine cible est efficacement produite, qu'elle diffuse depuis le muscle ciliaire jusqu'au tissu à traiter impliquer dans la pathologie et qu'elle exerce une action thérapeutique (protéine biologiquement active). Les procédures mises en place (électrotransfert du muscle ciliaire, induction de la maladie, marquages des vaisseaux *in vivo* et *ex vivo*) pour réaliser le projet sont standardisées afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'obtenir des données statistiquement pertinentes (tests non-paramétriques). De plus, ces procédures sont peu traumatiques, de courte durée et réalisées sous anesthésie générale afin d'éviter le stress de la contention et toute douleur éventuelle. En complément, un analgésique local sera également instillé dans le sac conjonctival inférieur. Enfin, un gel ophtalmique sera appliqué après chaque procédure pour éviter la sécheresse oculaire.

Des points limites ont été identifiés et une grille d'évaluation a été mise en place afin de définir la conduite à tenir. Nous mettrons en place une observation journalière des animaux au cours des différentes expérimentations et une observation de gravité importante impliquera la mise à mort de l'animal avant la fin de l'étude.

17398 Le cortex cérébral contrôle la perception sensorielle ainsi que les fonctions motrices et cognitives (mémoire, pensée, réflexion...) 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. Il est également de plus en plus reconnu que l'élimination de certains types de cellules neuronales après la naissance est un processus essentiel pour le développement du cortex cérébral. Le maintien de ces cellules au stade adulte chez l'homme est associé à diverses malformations corticales (polymicrogyrie et dysplasie focal corticale) associées ou non à des crises d'épilepsie.

A cet égard, les cellules de Cajal Retzius (CR) sont un exemple remarquable. Les CR jouent un rôle clef dans différents aspects du développement cortical tels que la migration neuronale et la mise en place des aires corticales. Les CR sont divisés en 3 sous-populations selon leur origine : celles provenant du Septum, de l'Hem et de la PSB (Pallial-Sub-pallial Boundary) qui sépare le pallium (dorsal) du sous-pallium (ventral). Les CR subissent une étape de mort programmée massive à la fin du développement entre 4 jours et 10 jours après la naissance des souris et une infime minorité d'entre elles sont encore présente dans le cortex chez la souris après 24 jours.

Nos travaux ont impliqué l'apoptose dépendante de Bax comme étant seulement responsable de la mort d'une fraction de ces cellules.

Ce projet vise à identifier d'autres voies dont celle relayée par mTOR impliquées dans la survie cellulaire grâce à l'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiés. Durant les 3 années que dure ce projet nous allons utiliser au total 614 animaux nouveaux-nés et jeunes adultes sur lesquels nous réaliserons cinq procédures comprenant l'amplification des lots, des études de comportement et de sensibilité aux crises d'épilepsie induites par injection d'une substance chimique et finalement des études histologiques sur le cerveau de ces animaux.

L'utilisation de l'expérimentation animale pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement du cortex cérébral qui se forme de manière très similaire aux autres mammifères et qui ne peut pas être recréé par des approches *in vitro*. De plus, l'utilisation d'un modèle par des approches d'inactivation génétique est indispensable à la réalisation de ce projet et ne peut pas être réalisé chez d'autres espèces que la souris étant donné la nécessité de croiser des lignées murines déjà établies par ailleurs.

Toutefois, dans le respect de la règle des « 3R » (remplacer, réduire, raffiner), 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 un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement et par l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques lors de la procédure opératoire pour les études histologiques.

A terme, les résultats de ces travaux pourront nous permettre de mieux comprendre le rôle des cellules d'intérêt dans le développement cortical chez la souris mais aussi d'appréhender leur importance dans l'apparition d'épilepsie et de pathologies neurologiques chez l'homme.

17399 L'hypertension est l'une des maladies chroniques les plus fréquentes en France touchant environ 14 millions de Français. Sa prévalence est de 10 à 15 % dans les pays industrialisés. C'est une maladie silencieuse, principale cause de complications cardiovasculaires, cérébrovasculaires ou neurodégénératives (infarctus du myocarde, AVC, maladie d'Alzheimer...). L'hypertension artérielle est définie par l'O.M.S. comme une pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg et/ou une pression artérielle diastolique supérieure à 90 mmHg. L'un des principaux systèmes qui régule la pression artérielle est le système rénine angiotensine aldostérone (SRAA). Plusieurs médicaments existent pour réguler ce système. Le ramipril et le tandolapril sont des molécules de la classe des inhibiteurs de l'enzyme de conversion inhibent la conversion de l'angiotensine I inactive en, l'angiotensine II active, qui permet entre autres la vasoconstriction des vaisseaux sanguins. Une autre classe de molécules utilisée dans le traitement de l'hypertension qui agit lui aussi sur le SRAA, est le telmisartan.

Dans ce projet nous allons tester différentes formulations avec différents antihypertenseurs, qui cibleront toutes le SRAA. L'efficacité de ces formulations sera comparée avec les formulations orales disponibles sur le marché. Nous évaluerons l'efficacité des différentes formulations par :

- une prise de tension artérielle au niveau de la queue des rats
- par un dosage des molécules administrées présentes dans la circulation sanguine.

Dans cette étude, le concept des 3R sera respecté :

- Durant cette étude, nous prévoyons d'utiliser 540 animaux. Cette quantité d'animaux utilisée assure la validité scientifique et statistique de cette étude, dès que possible. Le groupe de contrôle sera commun à plusieurs études (réduire - Raffinement)

-tout essai d'une formulation sur les animaux était préalablement testé sur des échantillons de peaux d'animaux *in vitro* (remplacer)

-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 :

i) Perte de poids de 15% ou plus (diminution de la prise de nourriture).

ii) Changement de comportement (prostration, apathie, agressivité, moindre mobilité, agitation)

iii) Modification de l'apparence externe (dos rond, poils hirsutes).

Les animaux présentant un de ces critères seront euthanasiés à l'aide d'une boîte à CO₂ dans une salle dédiée. Ce monitoring sera réalisé en lien avec le responsable du bien-être animal.

17400 Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive.

Malgré une thérapie très agressive reposant sur une chirurgie associée à l'utilisation concomitante de la chimiothérapie et de la radiothérapie (Protocole de Stupp), le taux de survie des patients reste très faible (médiane de survie : 14,6 mois et survie à 1 ans < 30 %).

En effet, les propriétés invasives des cellules tumorales de GBM rendent son ablation complète impossible, conduisant alors à l'émergence de nouveaux foyers de prolifération, localisés à proximité de la zone de résection, et à une rechute rapide du patient.

Les radiothérapies font partie du traitement visant à détruire les cellules tumorales mais elles provoquent également la mort des cellules normales (astrocytes, cellules endothéliales, cellules stromales...) dans la zone péritumorale irradiée.

Il est important de connaître l'impact de ce changement homéostatique sur l'apparition des récives du GBM.

Pour étudier les effets de la radiothérapie, nous disposons de modèles de cellules de GBM transplantables dans des souris sauvages et immunodéficients dans lequel les cellules tumorales peuvent être mises en évidence avec une caméra qui détecte la bioluminescence qu'elles émettent ou par μ IRM.

Nous disposons d'un irradiateur couplé à un scanner qui permet une irradiation très localisée et précise d'une partie du cerveau d'une souris.

Notre projet comporte 2 volets :

A) Etude du changement de cellules stromales dans le tissu cérébral irradié cf schéma A

Une première étude permettra de tester une gamme de doses d'irradiation de la moitié du cerveau. Les souris seront mises à mort chaque mois pendant 12 mois après irradiation afin d'effectuer une étude histologique de leur cerveau avec les différents marqueurs des cellules stromales.

5 souris pour une dose

5 doses

12 temps

Il faudra 300 souris C57 BL/6

Nous pourrons ainsi connaître à quelle dose et au bout de combien de temps est obtenu le plus fort dommage cérébral dû à l'irradiation.

B) Etude de l'impact de la perte de l'homéostasie cérébrale sur la progression du GBM cf schéma B

3 conditions expérimentales

1) Un groupe non irradié

2) Un groupe irradié faiblement sans modification de l'anatomie cérébrale

3) Un groupe irradié avec changement de l'anatomie cérébrale

Les 3 groupes recevront après irradiation une greffe intracérébrale de cellules syngéniques de glioblastome dans les souris sauvages ou une greffe avec les cellules de 2 primocultures humaines dans les souris NGS.

Puis, les souris seront irradiées ou non le jour suivant et le suivi s'effectuera par μ IRM et par luminescence avec une étude de la survie ou une mise à mort des animaux à 4 jours, 15 jours et 1 mois pour des études histologiques.

Survie

10 souris par groupe, 3 3 groupes

- non irradié,

- irradié faiblement sans modification de l'anatomie cérébrale,
- irradié avec changement de l'anatomie cérébrale

30 souris C57 BL/6 et 60 NSG seront nécessaires pour une expérience.

Nous ferons 2 expériences pour des raisons statistiques.

Pour les études de survie 60 souris C57 BL/6 et 120 NSG seront nécessaires.

Nos résultats seront exprimés par les courbes de survie de Kaplan–Meier.

Concernant les traitements, un nombre de 10 animaux est nécessaire pour comparer la significativité des résultats obtenus entre les différents groupes expérimentaux.

Etude histologique

5 souris par groupe, 3 groupes, 3 temps

- non irradié,
- irradié faiblement sans modification de l'anatomie cérébrale,
- irradié avec changement de l'anatomie cérébrale

Donc 45 C57 BL/6 et 90 NSG seront nécessaires.

Les souris C57BL/6 seront des femelles.

Les NSG seront des souris des 2 sexes.

Au total, ce projet nécessitera 405 souris C57BL/6 et 210 souris NSG, soit 615 souris.

Le modèle animal est indispensable et non substituable pour de telles études, avant de commencer des études chez l'homme.

Règle des 3R:

- Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant des images qui permettent de suivre le même animal dans le temps tout en conservant le nombre de souris nécessaires pour un résultat statistique significatif.

Le nombre d'animaux pour cette saisine prend en compte cette règle.

- Raffiner en maintenant les souris par groupe de 5/ cage enrichie (frisottis) et en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique ainsi qu'en fixant des points limites stricts qui conduisent à la mise à mort.

- Nous assurerons une anesthésie et une analgésie si nécessaire pendant chaque procédure et tout au long de l'expérience.

17401 Ce projet va permettre de mieux comprendre et préparer les futurs vols spatiaux de longue durée.

L'accélération gravitationnelle fournit le plus important stimulus évolutif pour toute la vie terrestre sur Terre. Chez l'homme, par exemple, le système cardiovasculaire produit un puissant réseau de pression hydrostatique à travers lequel le sang se propage à l'ensemble du corps, agissant souvent contre la gravité, alors que le système musculo-squelettique produit des forces qui agissent contre la gravité et nous permettent de marcher, de courir et de monter avec une perception spécifique du mouvement et de l'orientation.

Lors d'un vol spatial, la microgravité est un des facteurs environnementaux qui subit le plus de modifications. Actuellement, les voyageurs de l'espace sont recrutés sur des performances physiques exceptionnelles, et pourtant, leurs organismes sont soumis à des conditions anormales et sont fortement affectés. Un des systèmes les plus atteints est sans doute le système musculo-squelettique, avec une fonte musculaire très importante, et une forte diminution de la densité minérale osseuse. Lors du retour à la gravité terrestre, Les astronautes courent un risque accru de s'évanouir, de tomber, d'avoir des blessures dues à un accident, des fractures de fragilité et ont des difficultés à reprendre des activités liées à la vie quotidienne.

De très nombreux travaux sont disponibles dans la littérature sur l'évolution osseuse en microgravité. Ces travaux sont de deux ordres : des travaux biologiques très nombreux visant à comprendre et

mesurer les actions cellulaires sous différentes conditions d'hypogravité, pour différentes structures osseuses, pendant et après les vols spatiaux.

Cependant, ces travaux ne sont que peu ou pas couplés à la mécanique locale osseuse et il n'est pas possible d'identifier les modèles comportant une mécanique fine avec les observations expérimentales actuellement disponibles. En effet, il faut pouvoir identifier les variables internes du modèle, construit dans le contexte physique du milieu local. Cela demande une série d'informations et de cinétiques dont nous ne disposons pas dans les travaux actuels.

L'objectif du projet est de poursuivre la construction d'un modèle mécanobiologique 3D de prédiction de l'évolution de la densité osseuse à l'aide de données biologiques spécifiques. Ce modèle est fondé sur des bases couplées physiques, biologiques et mathématiques. Il a déjà donné de bons résultats dans un contexte d'évolution de la densité osseuse sous contraintes mais il mérite d'être amélioré et d'être étendu et adapté au cas de l'hypogravité. Ce modèle est à la fois local et macroscopique, passant les changements d'échelle par des méthodes mathématiques d'homogénéisation. Il s'appuie sur les travaux scientifiques les plus récents.

Les objectifs de ce projet sont :

De caractériser et d'expliquer chez le rat les effets de l'absence de contraintes mécaniques sur l'os à l'échelle d'organe, c'est-à-dire sur ses propriétés structurales, mécaniques et biologiques, ainsi qu'à l'échelle locale, notamment cellulaire, c'est-à-dire sur l'ostéocyte (cellules qui dirigent la formation et le remodelage osseux), sa matrice environnante et les ostéoclastes (cellules responsables de la résorption osseuse dans le remodelage).

Pour cette étude, seront nécessaires au total 102 rats Wistar, répartis en: 1 groupe de 6 rats "pré-expérimental" + 4 groupes (4 « contrôle », 4 « hypogravité ») de 12 rats par groupe :

- 4 groupes « hypogravité », composés de rats au même stade de maturité (jeunes adultes), testé sur 4 semaines.

- 4 groupes de rats sédentaires (groupe CTRL de mêmes sexe et âge) permettra de contrôler les effets de l'hypogravité.

Les animaux seront testés à quatre reprises (à 7, 14, 21 et 28 jours). A chacun des temps 1 groupe expérimental et 1 groupe témoin seront sacrifiés pour permettre une étude histologique du tissu osseux.

L'évolution de la composition corporelle (masses maigre et grasse), de la microarchitecture osseuse sera évaluée en micro-scanner. Les biomarqueurs sanguins du métabolisme osseux, des facteurs de croissance et de l'état inflammatoire systémique seront également dosés. Les acquisitions au microscanner et les prises de sang seront réalisées pour les 8 groupes de rats sous anesthésie à l'isoflurane.

Après la mise à mort des animaux, les échantillons osseux seront prélevés et les propriétés structurales (microscanner, histochimie, marquages aux tétracyclines), biomécaniques (nano-indentation) de l'os ou du tissu de cicatrisation osseuse étudiées. Les caractéristiques cellulaires à l'échelle de l'ostéocyte et de sa matrice seront déterminées.

Considérant que l'hypogravité a des effets systémiques, son étude sur les propriétés de l'os et les biomarqueurs du remodelage osseux ne peut être envisagée in-vitro, d'où la nécessité d'une étude chez l'animal. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons un même os pour plusieurs méthodes de caractérisation (biologiques, mécaniques et imagerie multimodale).

Les acquisitions en microscanner et la prise de sang seront réalisées dans un même temps sous anesthésie gazeuse. L'absence de souffrance ou d'inconfort (diminution de l'appétit, de l'activité, boiterie...) sera contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude grâce à un tableau de score. : Selon ce score et les manifestations douloureuses de l'animal, une hiérarchie – gradation- de soins adaptés, pouvant aller jusqu'à la mise à mort, sera appliquée.

Les cages d'hébergement sont adaptées aux rats, contiennent des copeaux et une structure de jeux permettant l'expression des comportements de fouissage. L'alimentation et l'eau sont données ad-libitum.

Cette étude permettra de mieux comprendre l'impact de l'hypogravité sur les propriétés structurales, mécaniques et biochimiques du tissu osseux, par l'obtention d'informations fondamentales.

Informations qui nous permettront de créer un modèle numérique prédictif, et ainsi anticiper et prévenir les pertes osseuses chez les astronautes.

17402 La pollution atmosphérique est reconnue comme étant la principale cause environnementale de maladies et de décès prématurés dans le monde selon l'organisation mondiale de la santé. Les effets sur la santé de la pollution atmosphérique ne dépendent cependant pas seulement de la qualité de l'air ; d'autres paramètres comme la vulnérabilité individuelle des sujets concernés peuvent rentrer en ligne de compte. Ainsi, l'âge des sujets, mais aussi l'existence d'une pathologie sous-jacente comme la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou la mucoviscidose sont des paramètres qui influencent les conséquences notamment respiratoires d'une exposition à la pollution atmosphérique. De plus, la pollution atmosphérique s'inscrit dans le contexte d'un concept plus large initialement introduit par Christopher Wild en 2005, concept qui englobe la totalité des expositions (pollution de l'air, mais aussi facteurs socio-économiques tels qu'activité physique, régime alimentaire, taille de la fratrie, ..., prématurité, modifications épigénétiques, lipidomique...) auxquelles chaque être humain est exposé tout au long de sa vie, depuis la conception jusqu'à la fin de vie : l'exposome.

Nous nous intéressons à étudier le rôle de l'exposome dans le cours de deux pathologies chroniques respiratoires : la BPCO et la mucoviscidose. Ces deux pathologies, ont en commun une atteinte progressive et irréversible de la fonction respiratoire. Elles se caractérisent aussi par une expression très variable de la maladie (dans sa sévérité notamment). Les déterminants de cette variabilité restent largement méconnus à l'heure actuelle, alors même que cette variabilité impacte grandement la qualité de la prise en charge thérapeutique des patients atteints.

L'intérêt d'étudier en parallèle la BPCO et la mucoviscidose réside dans l'apparent antagonisme de leurs origines : avec l'exposition tabagique comme principal facteur de risque, la BPCO apparaît comme liée à l'exposome (externe). À l'opposé, la mucoviscidose étant une maladie d'origine génétique, elle semble indépendante d'une influence de l'exposome. L'hypothèse est ici qu'une caractérisation fine de l'exposome des patients BPCO ou atteints de mucoviscidose pourrait permettre de mieux comprendre leur variabilité phénotypique, et ainsi résulter en une meilleure prise en charge thérapeutique des patients concernés.

Nous proposons ainsi de répondre aux questions suivantes : 1/ un exposome spécifique est-il associé à un phénotype particulier de BPCO et de mucoviscidose ; 2/ un même exposome affecte-t-il de façon identique les deux pathologies ?

et 3/ l'exposition pendant la maturation pulmonaire à un exposome spécifique influe-t-elle sur la trajectoire de la fonction pulmonaire au cours de la vie.

Nous utiliserons des souris exposées à la fumée de cigarette comme modèle de BPCO, et des souris génétiquement modifiées (Cftr^{tm1EUR} et Scnn1b-Tg) comme modèles mucoviscidose. Pour l'exposition à la fumée de cigarettes, nous disposons d'une machine de type Teague® permettant là encore d'exposer les animaux sans les sortir de leur cage. Nous disposons d'un montage expérimental unique permettant la génération d'atmosphères polluées complexes, en association avec l'exposition d'animaux, ce qui nous permettra d'aborder la problématique des effets sur la santé d'expositions à la pollution atmosphérique avec un degré de complexité particulièrement pertinent.

Tout au long de ces études, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Les modèles murins choisis sont ceux le plus couramment utilisés dans la communauté scientifique s'intéressant à la BPCO et à la mucoviscidose. 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 ne 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, le nombre de mâles utilisés pour l'accouplement pourra être diminué (chaque mâle pouvant servir à plusieurs séries d'accouplement).

Les tests *in vitro* ne peuvent pas être à ce jour utilisés pour les études des effets de la pollution atmosphérique sur le développement pulmonaire et à l'âge adulte. Il en est de même pour l'étude de l'exposome dans sa globalité. Les études *in vivo* sont effectivement les seules permettant l'étude la toxicité des particules atmosphériques notamment à l'échelle de l'appareil respiratoire, en reproduisant

les mécanismes de pénétration et d'épuration pulmonaire des particules lors d'expositions uniques ou répétées.

Le projet prévoit le recours à un nombre d'animaux aussi limité que possible : 5330 souris au total (dont 3600 souriceaux à générer). Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences, ainsi les animaux présentant un ou plusieurs signes de souffrance (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer...) seront euthanasiés après anesthésie à l'isoflurane. Afin d'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.

17403 Nous souhaitons étudier le rôle de deux protéines spécifiques dans la fonction cardiaque, et plus particulièrement dans le cadre d'une altération telle qu'une hypertension.

Ces protéines semblent liées notamment à certaines atteintes musculaires dystrophiques d'origine génétique.

Ce projet vise ainsi à comprendre comment la suppression de l'une ou de l'autre de ces protéines pourrait modifier les réponses du système cardiaque lors d'une hypertension.

Cette dernière sera mise en place par le biais d'une exposition prolongée à un composé pharmacologique (l'angiotensine II) qui impacte le système cardiaque.

Ces travaux sont une étape nécessaire dans le développement de traitements potentiels de ce type de dystrophie ne disposant actuellement d'aucun traitement.

Le modèle Souris nous permet d'accéder à des animaux génétiquement modifiés, permettant d'étudier l'ensemble des fonctions d'une protéine au sein d'un organisme complet adulte.

Il s'agit d'une approche très utile pour déterminer la fonction d'une protéine dans un organisme vivant et ainsi orienter le développement de nouveaux médicaments.

Dans ce projet, nous prévoyons donc d'analyser des animaux génétiquement modifiés, ne disposant plus de l'une ou de l'autre des protéines.

Nous avons pu constater que ces animaux ne présentent aucun déficit majeur durant leur vie, mais leur fonction cardiaque n'a pas encore été étudiée.

Celle-ci sera donc étudiée en la comparant à d'autres animaux n'ayant pas cette mutation. Par ailleurs, ces deux groupes d'animaux seront comparés à deux groupes similaires recevant de l'angiotensine II, et présentant une hypertension.

Nous serons ainsi capables de comprendre si la fonction cardiaque est altérée par l'absence de protéine, et comment ce système évolue durant une hypertension.

Chaque groupe expérimental sera constitué de 12 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 96 souris pour ce protocole, comparant des animaux exprimant ou non un récepteur d'intérêt, dans des conditions physiologiques ou avec une hypertension (4 conditions au total pour chaque protéine étudiée).

REMPACEMENT : nous ne disposons pas d'une autre possibilité d'étudier la fonction d'une protéine dans un organisme vivant 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 le protocole pharmacologique n'entraîne 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 l'angiotensine II 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. Par ailleurs, nous avons déjà utilisé cette approche avec d'autres lignées génétiquement modifiées et avons pu constater que ces effectifs étaient nécessaires et suffisants pour conclure sur les résultats observés.

17404 Le projet de notre équipe de recherche est d'améliorer la compréhension des mécanismes de résistance aux traitements dans le cancer de la prostate en effectuant une recherche transversale qui doit bénéficier rapidement au malade.

Le cancer de la prostate est le cancer masculin le plus fréquent en France (plus de 50 000 nouveaux cas par an en France) et dans les pays occidentaux en général, nettement devant les cancers du poumon et du côlon-rectum. Plusieurs types de traitements peuvent être proposés: chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie et enfin hormonothérapie. Quand le cancer réapparaît après une hormonothérapie, il est alors appelé cancer de la prostate hormonorésistant. Notre objectif est alors d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires responsables de la résistance au traitement ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques en combinant recherche fondamentale et recherche appliquée. L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet synergique d'un inhibiteur de la MAPK p38 (SB202190) avec deux molécules d'hormonothérapie utilisées dans le traitement du cancer de la prostate métastatique, l'abiratéron et l'enzalutamide. Nous avons obtenu *in vitro* d'excellents résultats grâce à ce type de combinaison. Nous voulons donc maintenant confirmer ces résultats dans un modèle de souris portant des tumeurs de la prostate. Dans ce but nous prévoyons de réaliser trois expériences comportant chacune 6 groupes de 8 souris, ce qui résulte à 48 souris par expérience et donc 144 souris en total (3X48 souris).

Dans cette étude, la règle des 3R (Réduire-Raffiner-Remplacer) est respectée au mieux.

Réduire : nous avons fait de nombreuses expériences préliminaires *in vitro* pour obtenir des résultats solides et réduire la quantité d'animaux utilisés. Ainsi nous ne testerons que la combinaison de l'hormonothérapie (Enzalutamide ou Abiraterone) avec l'inhibiteur de p38, qui s'est avéré la combinaison la plus efficace. De plus, le nombre d'animaux sera déterminé avec discernement, après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante (pour ne pas avoir à refaire l'expérience).

Raffiner : nous avons raffiné les méthodes utilisées et mis au point des mesures destinées à réduire la contrainte, la douleur et la souffrance des animaux (enrichissement du milieu, suivi régulier des animaux, injection d'analgésiques en cas de douleur). Nous avons notamment mis au point une grille de suivi clinique des animaux répertoriant 33 points de contrôle (aspect général de l'animal, comportement dans la cage, comportement à la manipulation, poids, taille de la tumeur) et permettant de faire un score. C'est donc avec cette grille que nous prenons la décision de prendre en charge la douleur de l'animal ou de l'euthanasier.

Remplacer : enfin nous avons mis en place des méthodes de culture cellulaire hétérotypique (co-culture de cellules tumorales + cellules du microenvironnement tumoral) en trois dimensions (sous forme de sphéroïdes) pour mimer au mieux les interactions cellulaires, ce qui permet d'éviter l'utilisation des modèles animaux pour les cribles préliminaires de traitements efficaces. Une fois les meilleures molécules et combinaisons identifiées, nous devons utiliser des modèles animaux. En effet, l'utilisation de modèles animaux dans ce contexte est indispensable pour adresser un éventuel rôle toxique des traitements sur animal entier, en plus de l'effet anti-tumoral.

17405 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.

La protéine EB1 (End-Binding protein 1) est une protéine associée aux microtubules, qui gouverne ses principales fonctions dans la cellule. De nombreux travaux ont démontré les propriétés oncogéniques d'EB1 dans le GBM *in vitro* et *in vivo* et sa valeur de mauvais pronostic chez les patients. De plus, une valeur prédictive de l'expression d'EB1 de réponse à certains agents anti-microtubules, au niveau cellulaire puis confirmée sur l'animal, a été démontrée. Nous souhaitons maintenant étendre cette étude à un autre agent anti-microtubules nouvellement synthétisé : BAL.

Nous avons déjà validé l'efficacité anti-tumorale de BAL *in vitro* sur un large panel de lignées de GBM. De plus, la valeur prédictive de l'expression d'EB1 dans la réponse anti-cancéreuse de BAL a été démontrée *in vitro* car lorsque des cellules de GBM sont traitées avec BAL, nous observons un effet cytotoxique et antimigratoire plus important lorsque EB1 est surexprimée.

Afin de confirmer la valeur prédictive de l'expression d'EB1 dans l'efficacité de BAL *in vivo* dans la progression du GBM, nous grefferons localement (voie orthotopique intracrânienne) des cellules de GBM normales ou sur-exprimant EB1 dans un modèle de souris Nude, puis les animaux seront traités avec BAL (par gavage), ou avec deux autres agents anti-microtubules de référence pour comparaison. Nous évaluerons alors l'efficacité du traitement sur les animaux porteurs de tumeurs de GBM sur-exprimant EB1 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 290 souris est prévu pour la globalité de l'étude.

17406 La sérotonine (5-HT) est neurotransmetteur pouvant se lier à différents récepteurs. Un de ces récepteurs, le 5-HT_{2B} est exprimé dans le système cardiovasculaire (cardiomyocytes, fibroblastes, poumons), où son activation a été rendue responsable d'atteintes cardiaques et respiratoires. Or cette même stimulation pourrait être utile dans des maladies du système nerveux central, comme la dépression, l'impulsivité, la psychose, ou la sclérose latérale amyotrophique. Dans un modèle murin de valvulopathie pharmacologique, il a été démontré que la perfusion de nordexfenfluramine (NdF), agoniste puissant du récepteur 5-HT_{2B}, entraîne le développement d'une valvulopathie chez les souris. Dans les mêmes conditions expérimentales, d'autres stimulants de ce récepteur ne montrent pas de toxicité cardiaque et pulmonaire. Il est donc possible que les molécules responsables de valvulopathies activent un mécanisme pathophysiologique cardiotoxique 5-HT_{2B} dépendant, et que ce mécanisme ne soit pas activé par d'autres stimulants de ce récepteur. Cette étude va donc utiliser le modèle pharmacologique de stimulation du récepteur 5-HT_{2B} dans trois modèles de souris transgéniques, n'exprimant pas trois protéines potentiellement impliquées dans la « voie cardiotoxique » de certains stimulants du récepteur 5-HT_{2B}.

A ce stade des recherches, il n'est pas possible de Remplacer cette approche *in vivo*, par une approche *in vitro*. En effet, la complexité des systèmes biologiques générant des valvulopathies (moelle osseuse, sang et cœur) nécessite une approche sur animal entier, car il n'existe pas de modèle *in vitro* capable de reproduire ces systèmes. L'animal nous permet donc d'aller étudier l'effet de nos composés sur ces différents systèmes ainsi que les interactions responsables du développement de valvulopathies. Néanmoins, nous complétons toutes ces études par des analyses de biologie moléculaire, qui orientent

le choix des modèles animaux et permettent donc de Réduire le nombre de lignées transgéniques. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé selon la base des effets pharmacologiques observés et de l'hypothèse d'un effet très puissant associé à la mutation. Le nombre maximal d'animaux sera de 330. Nous avons Raffiné nos procédures de manière à limiter la chirurgie, les autres procédures étant non invasives et routinières. Lorsque nécessaire, une anesthésie et une analgésie seront utilisées. Notre laboratoire a une grande expertise de ce modèle et a déjà pu montrer que dans le délai de l'étude, aucune répercussion dommageable n'est observée, la valvulopathie étant totalement asymptomatique. Cependant les points limites généraux suivant seront vérifiés régulièrement (le hérissément/l'altération du pelage, le grimace scale : la position des oreilles, les vibrisses, l'aspect oculaire, les rougeurs oculaires/lacrimation, la prostration ou l'isolement, la réduction de l'appétit et ou de la prise hydrique, la présence de plaies).

Si l'un de ces paramètres est observé chez un individu, quel que soit son génotype, l'avis du vétérinaire sera demandé et les mesures adéquates seront prises (isolement et traitement ou mise à mort) en accord avec le SBEA.

17407 Le cancer de la prostate est le quatrième cancer le plus fréquent dans le monde et le deuxième plus commun affectant la population masculine (15 % dans les pays développés soit 1,1 millions de nouveaux cas en 2012). Malgré sa forte prévalence, le cancer de la prostate reste en manque de techniques d'imagerie permettant de le caractériser. En effet, si le scanner et l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) apportent des informations anatomiques, ces modalités sont une performance diagnostique limitée pour ce type de cancer notamment dans l'évaluation du stade de la maladie. L'imagerie nucléaire par Tomographie par Emission de Positons (TEP) au 18F-FDG est un outil de diagnostic performant dans de nombreux cancers ; cependant son exploitation pour le suivi du cancer de la prostate reste à l'heure actuelle très discutée. De même, la captation du radiotracteur 11C ou 18F-choline en TEP présente un intérêt limité dans la détection de ce cancer en raison de sa faible sensibilité et spécificité à distinguer les affections bénignes des infections malignes. Récemment développés, des radiotraceurs ciblant le PSMA (Prostate Specific MembraneAntigen) pour des approches théranostiques semblent prometteurs dans l'imagerie de ce cancer. Dans la pratique clinique courante, la combinaison de ces approches avec l'imagerie scanner ou IRM reste incontournable pour ajuster le diagnostic par imagerie. En effet, en IRM, la combinaison de l'imagerie morphologique (imagerie T2) et fonctionnelle (imagerie de diffusion) apporte l'information sur le stade tumoral. Cependant elles n'apportent pas d'indices sur la réponse métabolique aux traitements. Depuis peu, le développement d'une nouvelle méthodologie en IRM nommée CEST (Contrast Exchange Saturation Transfert) offre la possibilité de réaliser une cartographie métabolique résolutive dans un tissu. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'évaluer, la pertinence de l'imagerie multimodale pour la quantification *in vivo* de marqueurs prédictifs de la réponse au traitement. L'identification de remaniements précoces du métabolisme *in vivo* en réponse à la thérapie permettrait une ré-orientation du traitement en cas d'échappement et d'apparition de résistance afin de proposer une approche personnalisée de la prise en charge du patient. Pour ce projet, le suivi de la réponse thérapeutique en imagerie nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, la physiologie globale de l'individu entre en jeu dans la réponse thérapeutique et une étude *ex vivo* ou *in vitro* ne peut représenter la complexité du vivant. Ainsi le nombre d'animaux inclus dans ce projet est de 81 souris et a été optimisé conformément à la règle des 3R et est de 81 souris Nude NMRI. Ce nombre a été calculé afin de garantir une valeur statistique à l'étude menée. Au cours de ce projet, le nombre d'animaux nécessaires 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. Le suivi de la réponse thérapeutique en imagerie nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, la physiologie globale de l'individu entre en jeu dans la réponse thérapeutique et une étude *ex vivo* ou *in vitro* ne peut représenter la complexité du vivant. 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 cabanes).

17408 Au cours du siècle dernier, l'intensification des activités humaines s'est accompagnée d'une accumulation de CO₂ dans l'atmosphère de notre planète. En se dissolvant dans les océans, ce surplus de CO₂ entraîne une baisse du pH et de la teneur en carbonate des eaux marines, processus connu sous le nom d'acidification des océans. Combiné au réchauffement climatique, l'acidification actuelle des océans menace des espèces marines.

L'intensification des activités humaines a également généré un nombre croissant de composés chimiques potentiellement toxiques, rejetés dans l'environnement. Au regard de la méconnaissance actuelle sur la vulnérabilité des organismes dans un contexte de stress chimique associé au changement climatique, ce projet propose d'étudier la réponse physiologique (sur le cycle de vie complet) de l'épinoche à trois-épines, *Gasterosteus aculeatus*, exposée à une contamination chimique de type oestrogénique (l'éthinylestradiol, EE2) à une dose réaliste d'un point de vue environnemental (concentration mesurée dans l'environnement) et une modification climatique (réchauffement + acidification) issue des prédictions du GIEC pour 2100 en milieu marin.

Les conditions de température, pH et salinité prévues pour ce projet restent dans la gamme des valeurs auxquelles l'épinoche à trois épines est confrontée dans le milieu naturel de zones côtières notamment pendant l'été.

L'épinoche est une espèce euryhaline de petite taille, qui présente un cycle de vie court et qui habite les environnements d'eaux douces, estuariens et marins. Les données de la littérature confirment que dans les conditions que l'on souhaite tester dans cette étude, l'épinoche est capable de se nourrir, grandir et se reproduire sans présenter de signes de « mal-être ». Les épinoches utilisées dans cette étude proviennent d'un site expérimental. Ces individus, issus de géniteurs maintenus en mésosome en eau douce, correspondent à un « surplus » d'élevage.

Après acclimatation en eau de mer des épinoches précédemment élevées en eau douce, seront soumises à deux conditions climatiques différentes (conditions actuelles et prévues pour 2100 par le GIEC). Cette acclimatation à l'eau de mer, est prévue sur 1 mois, elle ne représente pas un facteur de stress pour l'épinoche qui dans le milieu naturel passe des systèmes fluviaux ou estuariens au milieu marin côtier. Dans l'ensemble de ces habitats, l'épinoche est capable de grandir et se reproduire sans présenter de signe de stress ou mal-être. Ces individus (Génération F0) seront ensuite exposés à de l'EE2 pendant leur gamétogénèse et reproduction. Les générations F1 et F2 issues de F0 (attendues pour mai 2021 et mai 2022) seront maintenues aux mêmes conditions climatiques que leurs parents et à nouveau exposées à l'EE2 pendant le développement larvaire et ensuite au stade adulte durant la gamétogénèse.

Au cours de chaque stade de développement (adultes, larves, juvéniles) des prélèvements tissulaires seront réalisés sur des poissons préalablement euthanasiés (par surdosage d'anesthésiant) afin d'évaluer les effets de différentes conditions sur l'organogénèse, la fonction de reproduction, les capacités de défense immunitaire, la régulation de l'équilibre acido-basique et ionique.

Les concentrations d'éthinylestradiol (EE2) visées pour les expositions aux stades larvaire et adulte sont celles identifiées en milieu côtier. L'EE2, présente dans les pilules contraceptives orales, possède un potentiel oestrogénique 10 fois plus élevé que l'œstradiol naturel (E2), et n'est pas complètement éliminé lors du traitement des eaux usées, entraînant une contamination des eaux de surface du monde entier. Par ailleurs, de nombreux composés xénobiotiques toxiques, présentent des propriétés oestrogéniques (alkylphénols, phtalates). Ainsi, l'exposition à l'EE2, permet d'appréhender les effets d'un stress chimique de type oestrogénique en s'affranchissant de l'utilisation de nombreux xénobiotiques présents sous forme de mélange complexe dans l'environnement.

Le nombre total d'animaux utilisé est de 8388.

Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

-Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément à identifier si une contamination chimique à l'EE2 modifie la capacité des poissons à

s'acclimater au changement climatique (réchauffement et acidification de l'eau) et inversement, si les conditions climatiques, modifient la « gestion » d'un stress de type oestrogénique.

-Réduire : Le nombre d'animaux est adapté au mieux pour permettre des analyses statistiques fiables malgré la variabilité de la réponse physiologique entre les individus. L'utilisation d'un composé (EE2) représentatif d'un stress de type oestrogénique, permet de s'affranchir de l'utilisation de mélanges complexes de xénobiotiques qui nécessiterait un nombre de modalités différentes, et donc de poissons, très conséquent.

-Raffiner : Les conditions d'élevage sont optimales pour l'espèce. Un enrichissement des bassins de stabulation sera assuré avec la présence d'algues artificielles et d'abris en plastique. Toutes les manipulations sont pensées pour réduire au maximum le stress des animaux. De cette façon nous garantissons le bien-être des animaux. L'expérimentation et les prélèvements seront réalisés par du personnel qualifié (expérimentateur niveau II, qui connaisse le modèle poisson) en respectant les règles d'hygiène, de sécurité et d'éthique. Le raffinement est également appréhendé à travers le solvant utilisé pour l'exposition à l'EE2. Dans cette étude, l'EE2 sera dissous dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO) avant contamination de l'eau des bassins. Ce solvant ne montre pas d'effet toxique sur les poissons aux concentrations utilisées.

17409 Les maladies chroniques du foie d'origine non alcoolique sont caractérisées par une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de graisses dans le foie, en absence de toute consommation d'alcool ou d'hépatite liée à une infection virale ou à une maladie auto-immune. La prévalence est de 25% dans la population totale mondiale. Elles sont, dans la majorité des cas, considérées comme une maladie bénigne du foie. Cependant certains patients développent une manifestation plus sévère, la stéatohépatite non alcoolique (NASH) qui se caractérise par une accumulation d'acides gras dans les cellules du foie, une inflammation et une fibrose (destruction progressive du tissu). Dans les cas extrêmes, la NASH peut évoluer vers une cirrhose voire un cancer du foie. La mortalité chez les patients atteints de NASH est d'environ 7% et peut atteindre 36% chez des personnes souffrant par ailleurs de maladies cardio-vasculaires. Actuellement, seules des modifications de comportement alimentaire et physique réduisent l'impact de ces pathologies chroniques du foie. Il n'existe aucun traitement thérapeutique dans cette indication précise.

L'objectif de ce projet est d'identifier dans des modèles murins de NASH des biomarqueurs d'imagerie pertinents et quantitatifs, utilisés en clinique humaine, pour suivre l'évolution de la maladie et avoir à disposition des critères d'efficacité de futures pistes thérapeutiques. A ce jour, il n'existe pas de méthodes *in vitro* substitutives pour nous permettre d'évaluer l'effet d'un traitement dans la stéatohépatite. Le recours à des modèles animaux est nécessaire pour pouvoir intégrer toutes les interactions hormonales, inflammatoires et neuronales impliqués dans la pathologie hépatique. Nous induirons l'apparition progressive d'une NASH chez des rongeurs par différents régimes nutritionnels en modifiant la composition des croquettes alimentaires (régime hypercalorique et/ou déficient en acides aminés essentiels). Deux types de régimes alimentaires induisant des cinétiques différentes d'apparition de la NASH chez la souris seront ainsi étudiés. Ces régimes alimentaires n'induisent pas de modification comportementale ou physiologique nette sur les durées qui seront envisagées dans ce projet.

Nous mesurerons le degré de la stéatohépatite et son évolution vers des complications plus sévères grâce à des techniques d'imagerie dite « non invasives » telles que l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la tomographie par émissions de positons (TEP), techniques utilisées également chez l'humain. Nous chercherons ensuite à confronter les résultats obtenus aux paramètres histologiques et métaboliques (charge et teneur en acides gras).

Les modèles de NASH sont très bien décrits chez la souris. Les souris sont utilisées à l'âge adulte. Elles sont hébergées en groupes sociaux dans des cages enrichies de coton et de litière adaptée. Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que le fouissage, l'exploration ou encore la nidification. Elles feront, de plus, l'objet d'une observation visuelle, comportementale quotidienne, ainsi que d'un suivi du poids corporel régulier. L'ensemble des examens d'imagerie qui sont envisagés sont indolores et non-invasifs et permettent donc un suivi longitudinal de la progression de la maladie chez l'animal ; réduisant de fait le nombre d'animaux nécessaires à la

réalisation du projet. Durant l'acquisition des données, l'animal est anesthésié et les constantes physiologiques (température rectale, respiration) sont monitorées afin de prévenir la survenue d'événements inattendus au cours de l'expérimentation. A la fin de l'examen, l'animal réintègre sa cage dès son réveil. Dans le cadre de notre approche de recherche de biomarqueurs d'imagerie pertinents pour l'approche thérapeutique, on estime à n=202 le nombre de souris qui seront utilisées sur les 5 ans du projet.

17410 La barrière hématoencéphalique (BHE) est placée entre la circulation vasculaire périphérique et le système nerveux central. Cette "barrière", loin d'être totalement étanche est en fait un système de régulation complexe et sélectif du passage de différents éléments d'un compartiment à l'autre. Ainsi, le passage des nutriments vers le cerveau mais également de certaines cellules du système immunitaire ou même des médicaments est régulé par cette structure. De la même façon la clairance cérébrale (sortie) de molécules toxiques est également impactée par la perméabilité de cette barrière.

La sérotonine est un neurotransmetteur présent dans le cerveau et également une hormone libérée par les plaquettes sanguines. Elle a donc un rôle physiologique à la fois dans la circulation périphérique et dans le système nerveux central. Pour autant, la présence de récepteurs à la sérotonine à la surface des cellules qui composent la BHE et leur rôle dans la régulation de la perméabilité de cette dernière n'ont pas été étudiés. Dans un modèle *in vitro* constitué de cellules issues de la BHE humaine, nous avons montré la présence du récepteur sérotoninergique 5-HT4 et mis en évidence que sa stimulation par le prucalopride augmente la perméabilité dans notre modèle de BHE.

Le prucalopride dispose déjà d'une autorisation de mise sur le marché dans une spécialité médicamenteuse humaine. Cette dernière est indiquée dans le traitement symptomatique de la constipation chronique chez les adultes pour lesquels les laxatifs n'ont pas les effets escomptés. Chez les patients recevant ce traitement, l'effet indésirable le plus fréquemment rapporté (17,8%) est la céphalée (mal de tête). Cet effet indésirable dont le mécanisme exact n'est pas connu laisse supposer une action pharmacologique de cette molécule au niveau central ou au niveau de la vascularisation cérébrale.

Notre projet vise à confirmer *in vivo* le rôle du récepteur 5-HT4 et à vérifier l'effet du prucalopride sur la modulation de la perméabilité de la BHE chez le rat en analysant l'action du prucalopride, un agoniste du récepteur 5-HT4.

Un agent de contraste à base de gadolinium sera administré à des rats. La diffusion de cet agent de contraste dans le cerveau est conditionnée par la perméabilité de la BHE. La perméabilité de la BHE ainsi que les zones cérébrales où la BHE est perméabilisée pourront ainsi être évaluées par imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM). Une IRM sera réalisée avant l'administration du traitement expérimental, à l'issue de 4 jours de traitement puis 48 heures après l'arrêt du traitement. Avant sacrifice, du bleu evans sera administré par voie intraveineuse afin de confirmer les observations obtenues par IRM par étude macroscopique de la coloration des tissus cérébraux.

Si pour des raisons techniques, la réalisation d'IRM n'est pas possible, seule l'administration de bleu evans sera effectuée pour évaluer la perméabilité de la BHE.

Ce projet suivra la règle des 3R :

Remplacer : les expérimentations *in vitro* ont permis d'affiner notre champ de recherche et de cibler nos expérimentations. Néanmoins la modélisation *in vitro* de la BHE connaît de nombreuses limites, notamment du fait de sa complexité structurelle. C'est pourquoi, nous souhaiterions étudier l'effet de cette molécule sur un modèle *in vivo*.

Réduire : nous limitons le nombre d'animaux au minimum nécessaire à une analyse statistique significative des résultats. Un nombre inférieur risque de nécessiter de renouveler les expérimentations et d'accroître finalement le nombre d'animaux utilisés. Trois IRM seront effectuées par animal et l'administration de bleu evans aux animaux après IRM et avant sacrifice permettra de limiter le nombre total de rats utilisés.

Raffiner : dans ce projet, les conditions d'hébergement sont standardisées au sein d'une animalerie centrale conventionnée et permettent de réduire le stress des animaux (enrichissement du milieu par bâtons type « aspen bricks » à ronger, hébergement en groupes, taille des cages sans dépasser 2-3

rats par cage). Les animaux sont surveillés quotidiennement par du personnel qualifié. L'IRM sera réalisée sous anesthésie. L'administration des traitements se fera au niveau de la veine de la queue après anesthésie de l'animal.

Nous souhaitons intégrer un effectif de 60 rats Wistar pour ces expérimentations.

Notre étude permettra d'envisager de nouvelles pistes de recherche dont certaines peuvent avoir une application clinique rapide : (1) augmentation transitoire de la perméabilité de la BHE afin de favoriser la distribution de principes actifs d'action centrale dans le cerveau (2) étudier l'effet du prucalopride sur l'élimination de toxines d'origine centrale (3) décrire l'interaction des plaquettes (stock périphérique important de sérotonine) avec la BHE

17411 Le terme « cancer » englobe un groupe de maladies caractérisées par la multiplication et la propagation anarchiques de cellules anormales. Si les cellules cancéreuses ne sont pas éliminées, l'évolution de la maladie va mener plus ou moins rapidement au décès de l'individu touché: chez l'Humain, les cancers sont la 1^{ère} cause de mortalité en France devant les maladies cardiovasculaires.

Un cancer peut être soigné par un ou une combinaison de plusieurs traitements (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie, immunothérapie ou traitement ciblé), la thérapie choisie étant à la fois adaptée au type de cancer et à l'organe touché.

Le projet porte sur l'évaluation de tolérance, chez des chiens, de nouveaux composés à visée thérapeutique humaine et vétérinaire, dans le traitement de pathologies cancéreuses.

Ces études permettront:

- de développer des traitements anti-cancéreux pour les chiens, avec une application clinique rapide sur des patients canins, permettant ainsi la prolongation de leur durée de vie.

- d'évaluer des traitements destinés à l'Homme: le chien est considéré comme un modèle pertinent pour certains cancers, cela nous permettra d'obtenir des données supplémentaires pour des applications en clinique humaine.

Notre projet est conçu pour mettre en application le principe des 3R de Russel et Burch (1959)

Remplacement: Le recours à l'animal de laboratoire a été décidé lorsqu'il n'est pas possible de faire autrement. Avant toute étude, l'absence de toxicité aiguë des produits aura été démontrée lors de tests préliminaires (*in vivo*, *in silico*, puis sur rongeurs avant de passer au chien.

Réduction : Une fois la décision prise, nous nous efforçons d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en maintenant nos chances d'obtenir un résultat significatif. Ainsi, le nombre d'animaux utilisé sera d'au maximum 60 chiens sur 5 ans, pour l'évaluation de plusieurs candidats thérapeutiques. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum permettant d'avoir des résultats scientifiquement exploitables. L'utilisation d'animaux vivants est indispensable car il s'agit d'évaluer le comportement des traitements au sein de l'organisme entier.

Raffinement :Le recours à l'animal étant indispensable et se faisant sur un minimum d'animaux, les procédures sont conçues pour limiter tant que possible toute forme de contrainte, d'angoisse ou de douleur. Durant tout le projet, une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux, notamment en conservant l'hébergement en groupe, par la mise à disposition de jouets régulièrement renouvelés, et par des interactions fréquentes avec les personnes en charge des soins (jeux, caresses, récompenses lors des pesées et examens cliniques...). Des effets secondaires sont susceptibles d'apparaître suite aux traitements anti-cancéreux: ils feront l'objet de traitements symptomatiques comme c'est le cas en clinique. Des points limites adaptés seront mis en place afin de limiter l'inconfort des animaux en cours d'étude.

Les animaux seront pris en charge par du personnel formé et habilité, et un suivi vétérinaire sera effectué de façon très régulière.

Le bénéfice attendu est l'obtention de données permettant un passage rapide à des essais cliniques chez le Chien, permettant la mise en place de nouveaux traitements anticancéreux, mais également l'exploration de nouvelles voies thérapeutiques chez l'Homme.

17412 Dans le milieu marin, le mercure (Hg) est un des métaux les plus problématiques du fait de sa persistance, de sa bioaccumulation dans les organismes et de la hausse de sa concentration le long des chaînes trophiques. Combiné à sa forte toxicité, notamment sur le système nerveux, le transfert du Hg dans le vivant compromet la santé des écosystèmes et de l'Homme.

Les données de Hg dans les céphalopodes sont trop rares au regard du fait i) que ces mollusques accumulent efficacement les contaminants, ii) qu'ils constituent une ressource marine d'intérêt croissant, iii) qu'ils ont une place centrale dans les réseaux trophiques marins, jouant un rôle clé dans les apports de Hg aux prédateurs supérieurs dont l'Homme et iv) que leur survie et leur capacité à se reproduire au terme d'une vie courte dépend d'un comportement complexe possible grâce à un système nerveux développé. De plus, compte tenu de la trajectoire actuelle des activités humaines, les céphalopodes devront faire face à des changements majeurs de leur environnement tels que i) une augmentation des entrées de Hg dans l'océan, ii) un réchauffement des eaux de surface de 2 à 4°C et iii) une augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone causant une acidification de l'eau de mer. La toxicité du Hg, potentiellement aggravée par l'acidification et le réchauffement, est totalement inconnue chez ces invertébrés.

Parmi ces céphalopodes, la seiche commune (*Sepia officinalis*) représente un modèle d'étude adapté pour i) évaluer les concentrations en Hg dans les juvéniles des Pertuis, ii) étudier les processus de bioaccumulation et l'effet de l'acidification sur les efficacités d'accumulation du Hg et iii) étudier les impacts combinés du Hg et de l'acidification sur la physiologie et le comportement des juvéniles.

Ce projet utilisant 545 animaux tient en compte et respecte la règle des 3R : Concernant le remplacement, ce projet ne peut se réaliser que sur des animaux vivants et le recours à d'autres stratégies d'expérimentation telles que des études *in vitro* ne s'avère pas pertinent. En revanche, dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, chaque animal permettra d'observer de nombreux paramètres : écotoxicologiques (croissance, respiration, biomarqueurs...), éthologiques (prédation, anti-prédation, activité et déplacement...) ainsi que la bioaccumulation du mercure.

De même, du point de vue du raffinement, les conditions d'élevage et d'exposition des différents animaux seront strictement contrôlées en fonction des besoins physiologiques à chacun des stades de développements afin de réduire le stress et favoriser le bien-être animal (exemples : proies vivantes, abris, fond d'aquarium foncé...).

17413 La protéine ACBP, « Acyl coenzyme A-binding protein », aussi appelée DBI pour Diazepam binding inhibitor, est une protéine intracellulaire capable de lier les esters d'acides gras, elle exerce aussi une action extracellulaire en se liant à d'autres molécules. Chez l'homme, les niveaux d'ACBP sont élevés dans des cas d'obésité, et réduits chez les personnes souffrant d'anorexie ; chez les rongeurs cette protéine joue un rôle dans le comportement alimentaire, son administration conduit à une augmentation de la prise alimentaire, et sur le long terme à une augmentation de la masse du tissu adipeux et à l'obésité. Cependant la plupart des études se sont intéressées à l'effet d'ACBP sur l'hypothalamus, et le rôle joué par cette protéine dans le bulbe olfactif est méconnu. Pourtant, l'olfaction joue un rôle important dans le comportement alimentaire, et une potentielle amélioration des performances olfactives grâce à ACBP pourrait expliquer l'augmentation de prise alimentaire observée chez la souris (à l'inverse, une inhibition de l'ACBP bulbaire pourrait diminuer la prise alimentaire). Nous mettrions ainsi en évidence une nouvelle cible d'intérêt dans le traitement des maladies métaboliques telles que l'obésité et ses co-morbidités.

Nous proposons d'étudier le rôle de cette protéine dans le bulbe olfactif de souris par des approches de perte et gain de fonction : les souris seront injectées de protéine ACBP recombinante dans le bulbe, ou d'anticorps neutralisants anti-ACBP (qui « désactivent » la protéine), enfin un troisième groupe contrôle recevra un anticorps inactif. Dans une exigence de Réduction du nombre d'animaux, ce dernier groupe servira également de contrôle pour la protéine recombinante. Un total de 36 souris (n=12 par groupe) sera nécessaire pour cette première étude qui permettra de mettre en évidence les effets aigus d'ACBP sur le bulbe olfactif.

L'utilisation de souris génétiquement modifiées ACBP-lox permettra, grâce à l'injection intra-bulbaire d'un virus AAV (adeno-associated virus) exprimant une protéine dite « recombinante » de supprimer le

gène de l'ACBP de façon spécifique dans le bulbe olfactif. Par cette approche nous pourrions évaluer les effets à long terme d'une carence en ACBP dans le bulbe sur le comportement alimentaire et l'homéostasie glucidique des animaux. Un total de 24 souris (n=12 pour les ACBP-KO et n=12 pour les contrôles) sera nécessaire.

Les tests réalisés permettront d'une part d'évaluer les performances olfactives « buried food test » (test non invasif qui mesure le temps mis par l'animal à détecter un aliment caché dans sa litière), mais également la tolérance au glucose et à l'insuline, paramètres souvent associés à la prise alimentaire.

Pour procéder à nos expériences, et en nous limitant à un panel statistiquement représentatif, nous aurons besoin de 60 souris.

Cette étude qui s'effectuera sur 2 ans ne peut se faire sur une autre espèce que la souris : par exemple, chez les Invertébrés, cette protéine n'existe pas. De plus, nous ne pouvons pas réaliser ces expériences *in vitro* ou sur cultures de cellules puisque pour notre étude nous avons besoin d'étudier la prise alimentaire et des paramètres métaboliques.

Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal 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 pré-, per- et postopératoires adéquats, à recourir à l'anesthésie et à l'analgésie, à appliquer les points limites établis préalablement et, enfin, à utiliser les procédures réglementaires et appropriées de mise à mort.

17414 Comprendre comment le cerveau encode, consolide, stocke et restitue nos souvenirs est fondamental en Neurosciences. Ces fonctions reposent sur une organisation très précise des cellules composant le cerveau et sur une connexion parfaite entre ces cellules. Lors du développement, les principales cellules du cerveau, les neurones vont se spécialiser en acquérant une forme asymétrique caractéristique, en développant un réseau de connexions important entre eux. Une malformation ou un dysfonctionnement de ces cellules et de leurs connexions peuvent avoir des conséquences sérieuses sur le fonctionnement du cerveau.

Les protéines de la Polarité Cellulaire et Planaire (PCP), principalement Vangl2, contrôlent la division asymétrique des cellules et la mise en place des connexions. Cette protéine s'accumule dans la région de l'hippocampe, une structure très importante pour l'apprentissage et la mémoire tout au long de la vie. Une meilleure compréhension du rôle de Vangl2 est essentielle pour mieux décrire les anomalies apparaissant dans certaines pathologies du cerveau. Dans ce projet nous étudierons si la mutation de Vangl2 a un impact sur la morphologie et la composition protéique des neurones au niveau de l'hippocampe. Nous utiliserons des souris transgéniques qui ne présentent aucun phénotype dommageable. Pour supprimer Vangl2 dans l'hippocampe, nous procéderons à des injections de virus dans le 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 sur des cellules en culture en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Cependant, il est important, une fois nos hypothèses testées *in vitro*, de vérifier leur véracité sur des modèles animaux *in vivo*.

Réduire : Nous utiliserons 2 lignées de souris transgéniques. Nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à ce projet à 224 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 7 animaux par groupe est nécessaire pour notre étude. Pour réduire le nombre d'animaux qui seront mis en reproduction, nous utiliserons à la fois les mâles et femelles issus des croisements.

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 avec un nid végétal, surveillés régulièrement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place.

Concernant la procédure de chirurgie, elle est effectuée sous anesthésie gazeuse et des analgésiques sont administrés avant et après la chirurgie pour limiter la douleur. Un suivi post opératoire est également mis en place pour s'assurer de la bonne récupération des animaux et réduire au minimum l'inconfort et la douleur de l'animal.

17415 L'obésité correspond à un excès de masse grasse qui entraîne des complications pour la santé. Cette pathologie est un problème de santé publique d'ordre mondial car plus de 2,8 millions de personnes meurent chaque année suite à un problème de surpoids ou d'obésité. Les lipides sont présents en quantité importante dans l'alimentation des pays occidentaux, et lorsqu'ils sont consommés de façon concomitante avec des sucres raffinés, ils sont très efficacement mis sous forme de réserve dans les cellules du tissu adipeux, mécanisme à l'origine d'une prise de poids importante, menant à des problèmes d'obésité et au développement des maladies métaboliques et notamment le diabète de type 2. Ce projet s'intéresse aux effets bénéfiques du régime alimentaire de type cétogène (KD). Ce type de régime exclut pratiquement les glucides pour favoriser une alimentation très riche en lipides. Dans une étude antérieure il a été démontré que le régime KD permet d'empêcher le développement du diabète qui commence à apparaître au bout de 16 semaines de régime HF (effet préventif). Ce nouveau projet se propose d'étudier l'effet curatif de l'alimentation KD chez des souris ayant un diabète avéré, c'est à dire à partir de 16 semaines de régime HF. Ce projet se propose également d'étudier les potentiels effets préventifs du régime KD utilisé sous forme "cure" de 2 semaines, pour se rapprocher des conditions qui pourront être utilisées chez l'homme. Dans les expériences, l'obésité et le diabète de type 2 seront induits par un régime enrichi en graisse et sucre (High fat diet, HF).

Il existe des acides gras saturés à chaîne moyenne (MCFAs, entre 8 et 10 carbones : C8–C10) qui semblent diminuer la prise de poids lorsqu'ils sont ajoutés à l'alimentation. Des études réalisées chez l'homme et sur des rongeurs ont montré que ces MCFAs induisent une augmentation de la dépense énergétique et une augmentation de l'oxydation des lipides comparativement à l'utilisation des acides gras à longue chaîne. Ainsi, il pourrait être intéressant d'ajouter une quantité de ces MCFAs aux lipides de la nourriture cétogène afin d'optimiser les effets bénéfiques du régime KD.

Ainsi cette étude se propose de démontrer :

- 1) les effets curatifs de l'alimentation KD enrichie ou non avec les MCFAs sur les symptômes de l'obésité et du diabète.
- 2) Les effets préventifs de l'alimentation KD intermittent (sans MCFAs), qui mime les périodes de "cures" réalisées chez l'Homme.

Il sera effectué un suivi de la prise de nourriture et de l'évolution du poids des animaux chaque semaine jusqu'à la mise à mort des animaux à la 22^{ème} semaine. Un test de tolérance au glucose sera réalisé à la 9^{ème}, 15^{ème} et 21^{ème} semaine et une mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque par pléthysmographie à la queue sera réalisé à la 20^{ème} semaine.

Concernant les 3R, et pour commencer le remplacement, ce projet « nutrition et santé » ne peut se faire que chez l'animal, afin d'évaluer la prise alimentaire, l'évolution du poids, le métabolisme des organes. Ceci inclut une analyse moléculaire des facteurs impliqués dans les voies de signalisation permettant les adaptations/désadaptations métaboliques. Un minimum d'animaux seront utilisés afin de pouvoir valider les hypothèses par l'analyse statistique des résultats. Le nombre total de souris sera de 50 pour l'ensemble du projet. Plusieurs prélèvements terminaux sont réalisés sur le même animal ce qui limite le nombre d'animaux utilisés. Concernant le raffinement, les souris seront hébergées deux par cage et bénéficieront des enrichissements classiques (cotons, batonnets en bois). Le stress que subissent les souris sera diminué au maximum. Pour les tests induisant un inconfort ou un stress, une phase d'habituation sera mise en place pour les minimiser.

En conclusion, ce projet permettra de mettre clairement en évidence les effets bénéfiques de régimes alimentaires basés sur l'alimentation cétogène, et l'utilisation de lipides à chaînes moyennes, aussi bien sur des paramètres morphologiques qu'au niveau de l'analyse moléculaire.

17416 En Europe, le traumatisme crânien (TC) est la première cause d'invalidité et de mort chez les enfants. Le TC résulte de l'application d'une force mécanique externe et soudaine entraînant des lésions

cérébrales. Selon la sévérité des lésions cérébrales, le TC est classé en 3 catégories : léger, modéré et sévère. Plus de 70% des TC sont modérés et ne portent pas atteinte à la vie alors qu'un TC sévère peut engendrer un handicap permanent ou la mort de l'individu.

Chez les enfants, un TC modéré peut entraîner de nombreuses séquelles perturbant la vie quotidienne. Ces séquelles peuvent avoir un impact sur la parole, la compréhension, la coordination des mouvements, l'humeur ou les capacités de raisonnement et de mémorisation. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant aux altérations sur le long terme de ces zones éloignées sont toujours méconnus. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de tels désordres à la suite d'un TC modéré.

Suite à un dommage cérébral, les astrocytes, connus pour jouer un rôle essentiel dans la transmission nerveuse, sont un des premiers types cellulaires à réagir en modifiant leur fonction. En particulier, des études chez la souris montrent que suite à un TC modéré l'expression de l'aquaporine 4 (AQP4), protéine impliquée dans la régulation de la quantité d'eau dans le cerveau, est modifiée. Ces modifications peuvent affectées les échanges d'eau entre les cellules cérébrales et le milieu extracellulaire et par conséquent impacter le fonctionnement physiologique des synapses (connexions entre neurones). De manière intéressante, pendant la phase de récupération d'un TC, le niveau d'expression et la localisation de l'AQP4 est rétabli. Ces observations suggèrent que l'AQP4 joue un rôle important dans la modification de l'espace extracellulaire induit par un TC. Curieusement, il a été démontré qu'une activité physique suite à un TC pouvait significativement améliorer les résultats cliniques.

Cependant les mécanismes permettant cette récupération sont encore mal connus. Notre projet vise à comprendre chez la souris le rôle essentiel que joue l'AQP4 sur le remodelage du cerveau après un traumatisme crânien modéré mais aussi pendant la phase de récupération.

Nous souhaitons ainsi :

- (1) étudier l'impact du TC sur le fonctionnement des synapses, sur le niveau d'expression de l'AQP4 dans les astrocytes ainsi que l'évolution de l'espace extracellulaire au cours du temps.
- (2) étudier l'impact de l'activité physique sur ces différents paramètres
- (3) démontrer que l'AQP4 est essentielle à la récupération du fonctionnement des synapses et donc des capacités physiques et comportementales.

Pour l'ensemble de l'étude, nous combinerons deux techniques complémentaires d'imagerie de pointes, l'IRM à la microscopie à super-résolution, couplées à des études comportementales. Dans ce projet, 240 souris seront utilisées dont 120 souris C57Bl6 et 120 souris transgéniques.

Dans le but de garantir au mieux le respect du bien-être animal, toutes les procédures expérimentales utilisées dans ce projet ont été conçues dans la lignée de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Refinement). L'objectif de ce projet étant de caractériser le lien entre les modifications morphologiques et l'altération des fonctions des synapses et de l'espace extracellulaire, cette étude ne peut être réalisée de manière pertinente avec des modèles *in silico* ou *in vitro*. L'utilisation de l'imagerie chronique permet de réduire le nombre d'animaux, en imageant un même animal à différents temps. L'anesthésie lors des séances d'imagerie sera faite avec les molécules les plus adaptées. La qualité de la mise en œuvre des procédures (expertise reconnue de l'expérimentateur) permettra de prendre en compte, avec le plus grand soin, le confort de l'animal.

L'ensemble des mesures détaillées ci-dessus nous permet de veiller de façon optimale sur le bien-être des animaux de leur naissance à leur sacrifice pour des besoins expérimentaux. Les animaux seront hébergés selon les standards prévus par la réglementation européenne : en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi : matériel de nidification, rouleau en carton et barre à ronger. Le sevrage ne sera réalisé qu'au 25ème jour post-natal, cette procédure limitant le stress du sevrage. Les animaux seront observés une (avant traumatisme) à deux fois (après traumatisme) par jour minimum afin de s'assurer de leur bien-être au sein de la colonie.

17417 Les ruminants ont un système digestif particulier, à plusieurs compartiments (rumen, réseau, feuillet, caillette). Le rumen leur permet de valoriser les parois cellulaires végétales (fibres), par l'action des

microorganismes présents dans le rumen, qui dégradent ces fibres par fermentation anaérobie et produisent des acides gras volatils (AGV), valorisables par l'animal comme source d'énergie. La biomasse microbienne est aussi utilisée comme source de protéines par l'animal. A l'inverse, les microorganismes peuvent parfois détruire certains nutriments présents dans la ration, alors qu'ils sont essentiels à l'animal. Ils sont également à l'origine de la production de méthane, gaz impliqué dans l'effet de serre. Cette 1ère étape de fermentation ruminale du processus digestif, est donc essentielle et impactante à plusieurs niveaux, mais le fonctionnement des microorganismes impliqués reste encore peu connu et fait toujours l'objet de nombreuses recherches. Dans un contexte de raréfaction des ressources naturelles et de préoccupations écologiques, il est aujourd'hui fondamental d'améliorer nos connaissances sur l'évolution des composants de la ration au sein du rumen, afin d'optimiser l'efficacité alimentaire globale des animaux et de minimiser les pertes et les rejets au sein de l'environnement.

L'objectif de ce projet est d'affiner nos connaissances sur le fonctionnement du rumen, et de permettre l'évaluation scientifique du devenir et de l'effet sur l'environnement ruminal de différents constituants de ration, dans des environnements métaboliques standards ou perturbés (acidose, stress oxydant).

Le contenu ruminal est un milieu très complexe. A ce jour, la composition précise du « cocktail » de microorganismes présents dans le rumen n'est pas connue et donc non reproductible par culture 100% *in vitro*. Les études *in vitro* sont possibles, et font partie intégrante de ce projet, mais nécessitent quand même des prélèvements de jus de rumen pour apporter les microorganismes. De ce fait, le recours à l'animal (utilisé en tant que tel ou comme donneur de jus de rumen) reste indispensable. Le modèle animal retenu dans ce projet est la vache adulte équipée d'une canule ruminale. Cette canule, une fois posée, permet un accès direct au rumen sans douleur ni stress pour l'animal, quel que soit le nombre de manipulations. Plusieurs essais peuvent donc être réalisés sur le même animal, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. L'accès direct au rumen via la canule permet d'évaluer, par des méthodes standardisées, la fermentescibilité et la valeur nutritionnelle des différents composants de la ration, l'effet des matières premières et/ou des suppléments nutritionnels sur l'activité fermentaire et la production de produits de fermentation (acides gras volatils, ammoniac, méthane..), et l'effet des composants de la ration sur l'évolution du pH, paramètre essentiel pilotant l'activité des microorganismes et participant au confort digestif de l'animal.

Certaines procédures du projet intègrent des prises de sang, afin de pouvoir doser des indicateurs sanguins ou mesurer l'absorption de nutriments d'intérêt. L'utilisation de cathéters posés en début d'essai et retirés en fin d'essai pour la réalisation de ces prises de sang permet de limiter le nombre de piqûres et le stress pour l'animal. Certains de ces indicateurs (notamment celui permettant d'évaluer la croissance de la biomasse microbienne) se retrouvant dans les urines, certaines procédures intègrent des prélèvements urinaires. Ils sont alors réalisés par sonde, car la maîtrise du moment de prélèvement est indispensable.

Ces vaches canulées au niveau du rumen sont aussi utilisées comme "donneuses" de jus de rumen pour alimenter des fermenteurs *in vitro*. Ce type de dispositif permet d'évaluer simultanément un grand nombre de composants et de réduire le nombre d'animaux qui auraient été nécessaires si ces tests avaient dû être réalisés *in vivo*. Il permet aussi de tester l'effet de composants de rations ou d'additifs à des doses potentiellement toxiques, sans aucun risque pour l'animal (uniquement donneur de jus). Ces méthodes *in vitro* ne peuvent cependant pas totalement se substituer aux méthodes *in vivo* (directement sur les animaux), car elles n'intègrent pas les effets potentiels de la rumination, de la salivation, de la taille du rumen et de capacité d'adaptation des microorganismes *in vivo*.

Ce projet prévoit l'utilisation de 16 vaches maximum, sur 5 ans. Pour chaque procédure expérimentale, le nombre d'animaux utilisé est réduit à son minimum (2 à 4). Il existe une variabilité inter individuelle importante chez les ruminants, et l'utilisation de dispositifs expérimentaux en carré latin (tous les traitements sont testés sur tous les animaux), tels que prévus dans ce projet permet d'éliminer cet effet « individu » et de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des effets statistiquement significatifs.

Une fois canulées, les vaches sont utilisées dans plusieurs procédures, avec l'accord du vétérinaire en charge du suivi des animaux. Pendant les périodes de mesures, elles sont placées à l'attache, et disposent d'un matelas en caoutchouc pour se coucher. Un temps de repos obligatoire, sur aire paillée, entre 2 utilisations est prévu. Des points limites sont également définis dans chaque procédure, tels

que l'apparition de boiterie ou de refus pendant l'alimentation. S'ils sont atteints, l'animal est remis dans les conditions d'élevage standard. L'ensemble des manipulations et mesures sur les animaux est réalisé par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficient d'un suivi rapproché par les animaliers locaux, ainsi que par les différents intervenants notamment le vétérinaire.

17418 La radiothérapie est un traitement anticancéreux dont bénéficie plus d'un patient sur deux. Elle est basée sur les effets délétères des rayons X à forte dose et sur son efficacité par mort des cellules tumorales en fonction de la puissance du rayonnement. Désormais, le fractionnement en plusieurs séries de séance de traitement par radiothérapie a permis de supprimer certaines tumeurs de petite taille et les lésions métastatiques (lésions cancéreuses provenant de la tumeur primitive). Il permet d'appliquer des doses élevées par fraction avec des taux de réponse anti-tumorale importants. Mais l'efficacité anti-tumorale est plus complexe et dépend aussi du système immunitaire de l'hôte. De plus les combinaisons associant de la radiothérapie et de l'immunothérapie montrent une amélioration de l'efficacité de la radiothérapie. L'immunothérapie vise à conditionner l'organisme à combattre la tumeur. Lorsqu'on délivre une dose adéquate, une inflammation est générée favorisant ensuite l'efficacité des cellules immunitaires qui vont aider à la destruction de la tumeur.

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 et les irradiations seront réalisées grâce à un système d'irradiation du petit animal permettant des irradiations fractionnées. La progression tumorale sera quantifiée par imagerie nucléaire et par scanner à rayons X. 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.

Après implantation des tumeurs (cellules tumorales LL2, implantées par voie chirurgicale), les animaux seront imagés par tomographie à émission de positons (TEP). La TEP consiste à marquer une molécule radioactivement et la localisation de la radioactivité sera dépendante de la cible de cette molécule. Dans ce projet, deux molécules différentes seront utilisées pour permettre l'évaluation de la réponse tumorale directe à l'irradiation à la suite de l'inflammation générée par les rayons X. L'imagerie sera faite pour les différents groupes d'animaux à J3, J5 et J7 pour étudier la réponse à l'irradiation ou à J7 et J10 pour l'étude de la récurrence tumorale. A la suite de la dernière série d'imagerie, les animaux seront euthanasiés sans arrêt de l'anesthésie, afin de corréler l'imagerie *in vivo* avec l'analyse *ex vivo* de la captation du produit radioactif dans les poumons par une technique complémentaire de l'imagerie, l'autoradiographie.

Dans ce projet, la règle des 3R, réduction, raffinement et remplacer sera respectée. L'utilisation de modèles de substitution pour modéliser des pathologies et l'efficacité de traitement n'est pas possible dans notre cas. 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. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Des calculs statistiques ont été réalisés en amont et ont été validés par le comité scientifique en charge du suivi de ce projet. Ce projet multi sites nécessite 260 souris 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). Chaque groupe est composé de 10 animaux. Ces différents groupes seront caractérisés par la puissance des rayonnements (aucune, faible, moyenne et forte puissance, $10 \times 4 = 40$ animaux) utilisés et le prétraitement par immunothérapie des cellules tumorales avant implantation (2 traitements différents envisagés ou sans traitement, $40 \times 3 = 120$ animaux). Deux traceurs en imagerie TEP seront utilisés ($120 \times 2 = 240$ animaux) et enfin 20 animaux seront utilisés pour la mise en place des procédures d'imagerie ($240 + 20 = 260$ animaux). Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées vont permettre de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux (anesthésie adaptée pour les injections tumorales, les irradiations et l'imagerie, points limites spécifiques) avec une surveillance quotidienne. Les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi par du coton ou des nids en carton et en leur permettant de vivre en groupe de 2 à 5 souris. Des points limites ont été établis pour ce projet pour éviter toute souffrance de

l'animal, le dépassement d'un score pré-établi par une grille d'évaluation des points limites entrainera l'euthanasie de l'animal. L'euthanasie des animaux sera réalisée selon les méthodes approuvées par une personne compétente de l'établissement utilisateur. Le transport des animaux sera effectué par transporteur agréé.

17419 Le développement du cerveau est un processus complexe qui dépend de facteurs génétiques et de l'activité électrique du cerveau. De nombreuses études ont montré qu'une activité électrique anormale dans les phases précoces du développement pouvait conduire à long terme à un dysfonctionnement neurologique. Près de 50% des enfants ayant une déficience intellectuelle/motrice ont une épilepsie et une question fondamentale est de savoir si l'épilepsie est la cause du retard psychomoteur ou si c'est le développement cérébral anormal qui est responsable à la fois de ce retard et de l'épilepsie. La réponse à cette question est importante pour déterminer quel serait le traitement le plus adapté et quand celui-ci doit être appliqué pour améliorer l'épilepsie et la déficience intellectuelle.

Nous sommes particulièrement intéressés par les mécanismes physiopathologiques des encéphalopathies épileptiques précoces (EEP). Les EEP sont un groupe de syndromes épileptiques rares et dévastateurs associant une épilepsie débutant dans les 3 premiers mois de vie et un déficit cognitif et/ou sensoriel. Les causes des EEP sont diverses et une origine génétique a été mise en évidence avec plus de 50% des mutations de novo identifiées dans les gènes KCNQ2 et STXBP1. Le gène KCNQ2 code pour un canal potassique particulier de type Kv7 dont la fonction est de réduire l'excitation des neurones. Le gène STXBP1 code pour la protéine Munc18.1 essentielle à la libération des neurotransmetteurs. Cependant le mécanisme à l'origine des EEP est encore indéterminé. Nous proposons d'étudier les conséquences fonctionnelles de ces mutations afin de comprendre comment celles-ci affectent le développement cérébral. Pour cela nous disposons au laboratoire de souris portant la mutation c.821C>T du gène KCNQ2 à l'état hétérozygote, mutation observée chez les patients EEP et de souris hétérozygotes pour le gène STXBP1 reproduisant l'happloinsuffisance de la protéine Munc18.1 observée également chez les patients EEP. Nous avons réalisé des études *in vitro* visant à analyser l'impact de la mutation du gène KCNQ2 sur le fonctionnement des cellules corticales. Nous souhaitons maintenant pour compléter notre étude réaliser des enregistrements *in vivo*, afin d'analyser les activités électrographiques des animaux porteurs des mutations de KCNQ2 (T274M) et STXBP1. Nous souhaitons à plus long-terme tester *in vivo* l'impact de certains agents pharmacologiques pour tenter de contrer les effets que nous aurons observés.M)

Notre étude s'effectuera sur un total de 1500 souris. Ce chiffre correspond à l'ensemble des animaux des 2 lignées qui seront génotypes à un stade précoce (Procédure 2 : Génotypage de souriceaux (première semaine post-natale) avec coupe de phalanges) afin de définir dans quelles expériences ceux-ci seront utilisés : expériences *in vitro* ne nécessitant pas de demande de procédure ou expérience *in vivo* (Procédure 1 : enregistrement électroencéphalographique (EEG) chez l'animal jeune adulte et intracortical chez l'animal plus jeune), les animaux restant seront conservés pour l'élevage.

Le modèle murin permet de tirer des conclusions générales sur l'organisation corticale des mammifères, y compris chez l'homme

La conception de ce projet a été articulée pour appliquer au mieux les principes de la règle des 3R.

1) Remplacement : A notre connaissance, il n'existe actuellement aucune alternative à l'utilisation de modèles animaux pour comprendre les mécanismes physiopathologiques. Notre étude préliminaire sur cultures cellulaires nous a permis déjà de débiter ce projet afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

2) Réduire: Les expériences seront réalisées avec un souci permanent de réduction du nombre d'animaux. Une portée sera utilisée pour différentes expériences à différents stades (expériences *in vitro* ou EEG), les animaux restant seront conservés pour l'élevage. Pour les EEG, nous réaliserons des enregistrements intra-corticaux *in vivo* à 3 stades (P8, P20 et >P35) de développement sur des animaux contrôles et mutés (2 groupes d'animaux). Nous considérerons que lors de ces expériences nous aurons 30% à 50% de perte correspondant à la mortalité des animaux au cours de la chirurgie/anesthésie et les implantations d'électrodes au mauvais endroit (animaux non exploitables). Nous aurons donc besoin de : 195 animaux (20 animaux x 3 stades x 2groupes/0.7 ou 0.5 selon le

stade) pour chacune des 2 lignées de souris précitées (animaux porteurs des mutations de KCNQ2 (T274M) et haplosuffisant pour STXBP1). Soit un total de 390. Les 1110 animaux restants seront donc utilisés pour les expériences *in vitro* et l'élevage.

3) Raffinement: Les animaux sont hébergés en animalerie A1 (température, luminosité, cycle jour-nuit et hygrométrie contrôlée) avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. L'hébergement respecte les groupes sociaux. Les animaux font l'objet d'un suivi quotidien par les expérimentateurs et les zootechniciens, et leurs conditions d'hébergement sont enrichies (matériaux pour nidification, tunnels, dômes).

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). La récupération post-opératoire, la souffrance et la douleur sont évaluées et traitées (anesthésie et analgésie appropriée).

17420 Le prurit désigne une démangeaison liée à une infection ou une réaction inflammatoire cutanée ou générale, qui incite à se gratter. Ce symptôme fréquent peut avoir différentes origines : eczéma, sécheresse, allergie mais aussi troubles hématologiques, réactions médicamenteuses, cancers... Ce symptôme souvent ignoré peut s'avérer être aussi incapacitant qu'une douleur chronique. Le prurit peut être déclenché par des neurotransmetteurs (adrénaline), médiateurs (histamine) mais aussi des substances d'origines naturelles (chloroquine).

Actuellement il existe des traitements permettant de soulager le prurit, notamment les antihistaminiques qui sont appropriées lors de démangeaisons aiguës, cependant pour les démangeaisons aiguës et chroniques, les antihistaminiques semblent jouer un rôle défavorable et sont insuffisants lorsqu'ils sont utilisés dans le cadre d'une dermatite chronique atopique, comme un lichen simplex chronique. En général, le prurit récidive lorsque le traitement antihistaminique n'est pas associé à une thérapie complémentaire. Ceci est aussi valable pour d'autres substances comme la ciclosporine A. Il existe aussi les stéroïdes locaux, mais peu utilisés car ils ont un effet antiprurigineux de courte durée et possèdent des effets secondaires. 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 visée apaisante permettant de diminuer ou d'inhiber le développement de prurit. Le prurit est induit par administration intradermique d'un inducteur : soit l'Histamine soit la Chloroquine, dans le dos de l'animal. Une seule administration par animal d'Histamine ou de Chloroquine sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (2 à 3%) va induire une sensation de démangeaison autour du point d'injection. Ce modèle n'induit pas de douleur à l'animal autre que la pique. Les démangeaisons se manifestent moins d'une minute après induction du prurit, c'est à ce moment que les animaux sont observés pendant 30 minutes afin de déterminer le nombre de fois que l'animal se gratte. Les animaux seront mis à mort après les 30 minutes d'observation. Ceci permettra d'étudier l'efficacité des molécules à tester sur le développement du symptôme et de l'inflammation. Les molécules testées peuvent être administrées par voie orale, intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée ou cutanée sous forme liquide ou cutanée sous forme de crème de manière préventive, soit 30 minutes à 15 jours avant induction de la maladie ou de manière curative, au moment de l'induction de la maladie. Aucun signe clinique n'est attendu suite à l'administration des molécules à tester.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c due au fait que les deux souches de souris peuvent être utilisés de façon indifférente. 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'étude réalisée

durant la période de validité de l'autorisation dépendra du nombre de molécules à tester. Le projet pourra comporter jusqu'à 20 études incluant 90 animaux soit 1800 animaux au maximum.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant de tester des nouvelles molécules thérapeutiques ciblant le prurit.

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 du prurit 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 est mise en place, dont découlent des points limites (surveillance renforcée, mise à mort) afin de limiter la souffrance de l'animal. Mais aussi l'utilisation d'anesthésique afin de ne pas stresser l'animal durant l'épilation et l'induction de la maladie.

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.

17421 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 totalement 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 2256 souris sur 5 ans si un modèle souris est choisi ou 120 souris + 2178 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.

17422 Lors du développement d'un nouveau médicament à usage humain, il est indispensable de connaître ses propriétés pharmacologiques et son comportement dans un organisme.

Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule ou d'une combinaison de nouvelles molécules chez l'Homme, des tests *in vivo* chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont en effet, à l'heure actuelle, indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*. Dans ce projet, des prélèvements sanguins de faible volume et peu fréquents permettront de doser la concentration plasmatique du médicament et de suivre son évolution chez le primate non humain. Les effets secondaires associés à l'administration d'une nouvelle molécule ou d'une combinaison de nouvelles molécules peuvent également être qualitativement et quantitativement étudiés en fonction du temps.

L'utilisation du modèle primate se justifie par la spécificité des molécules à étudier. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez eux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiologiques chez l'Homme. De plus, les procédures de ce projet permettront d'établir une stratégie de prédiction de la biodisponibilité de chaque molécule chez l'Homme et/ou d'évaluer leurs effets dont la finalité est d'ajuster la dose administrable à l'Homme.

Durant la période couverte par ce projet, il est prévu d'utiliser 50 macaques cynomolgus par an (soit un total de 250 pour 5 ans), 10 vervets par an (soit un total de 50 pour 5 ans) et 10 macaques rhésus par an (soit un total de 50 pour 5 ans). Ces animaux seront tous issus d'un élevage agréé. Pour chaque procédure réalisée, il sera veillé à utiliser un nombre minimal et suffisant d'animaux pour que les résultats soient interprétables et transposables à l'Homme.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre les prélèvements ainsi qu'entre les administrations de la ou des molécule(s) étudiée(s). Des mesures préventives et correctives de diminution de la douleur et du stress seront déterminées au préalable de la réalisation de chaque procédure. Ceci sur la base des données préliminaires recueillies sur la molécule et ses effets. Dans le cas où les animaux feront l'objet d'une réutilisation, un avis vétérinaire sera obligatoire pour justifier du bon état de santé de l'animal. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

Dans le but de raffiner le suivi des animaux, des puces d'enregistrements télémétriques (mesure de température corporelle, fréquence respiratoire,) pourront être implantés en intra-abdominale selon une chirurgie précisément décrite dans les procédures de Cynbiose. Ces enregistrements permettront d'accéder à des données fiables, sans aucun stress pour l'animal et de manière continue dans le but de détecter rapidement toute dégradation clinique de l'animal. Cet acte sera réalisé sous anesthésie générale avec une chirurgie d'implantation de la puce avant le début d'étude et une chirurgie d'explantation de la puce (si l'animal n'est pas euthanasié) à la fin de l'étude afin de récolter les données enregistrées pendant l'étude.

17423 L'addiction aux opiacés (morphine et dérivés comme l'héroïne) constitue un réel problème de santé publique. En effet, les décès dus à une surdose d'héroïne représentent la plus grande source de mortalité directe liée à l'usage de drogues illicites. Les traitements de substitution actuels ont permis de réduire les décès causés par une surdose d'héroïne. Toutefois, ces traitements font l'objet de détournement et ne préviennent pas toujours les rechutes qui restent le problème majeur dans le traitement des addictions. La recherche de nouveaux traitements de substitution reste par conséquent un défi majeur. Le but de ce projet est d'évaluer, chez la souris, la capacité d'une nouvelle molécule à devenir un nouveau traitement de substitution aux opiacés. Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes psychiatriques, les méthodes alternatives actuelles sont insuffisantes. Les modifications

cérébrales et comportementales complexes étudiées s'inscrivent dans le cadre d'une étude intégrée et doivent donc être réalisées chez des animaux. La souris possède une organisation anatomique et structurelle du cerveau comparable à celle de l'Homme et peut réaliser des comportements élaborés. Nous utiliserons 3048 souris pour une durée de 5 ans. Le grand nombre d'animaux se justifie par la nécessité de comparer cette molécule aux deux traitements de substitution de référence, la méthadone et la buprénorphine. Ce projet met en jeu l'administration de substances à action psychotrope dont les effets respectifs seront étudiés grâce à des études comportementales. Nous évaluerons les effets de la nouvelle molécule seule dans deux modèles comportementaux d'addiction (mesure des effets renforçants, modèle de sevrage) puis nous mesurerons sa capacité à réduire les effets de la morphine dans ces mêmes modèles et dans deux procédures d'évaluation de l'état d'anxiété et de l'état dépressif.

Ce projet ayant pour but d'étudier des phénomènes psychiatriques et des processus pathologiques, les méthodes alternatives actuelles (e.g., modélisation, études *in vitro*) sont insuffisantes. En effet des modifications cérébrales complexes et des modifications comportementales qui s'inscrivent dans le cadre d'une étude intégrée, nécessite donc d'être réalisé sur des animaux. Afin de 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. De plus, lorsque c'est possible, des expériences seront réalisées de manière longitudinale (chaque animal est son propre témoin) permettant encore de réduire le nombre d'animaux. Les procédures comportementales de ce projet ne sont pas connues pour être douloureuses chez la souris. Une habituation préalable aux environnements où s'effectuent les tests sera respectée pour limiter le stress. Les animaux seront suivis quotidiennement et des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet va permettre de proposer une nouvelle molécule comme nouveau traitement de substitution aux opiacés.

17424 Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est une maladie respiratoire fréquente, qui touche 10 à 15% de la population et constitue un problème majeur de santé publique, notamment à cause du risque cardiovasculaire (hypertension, maladie coronarienne et insuffisance cardiaque) et métabolique (résistance à l'insuline et diabète de type 2) associé. Parmi les conséquences du SAOS, la répétition d'obstructions partielles ou complètes des voies aériennes supérieures induit une hypoxie intermittente (HI) chronique, reconnue comme étant le facteur le plus délétère en termes de complications cardiométaboliques. A ce jour, le traitement de référence est l'application d'une pression positive continue pendant le sommeil, qui, malheureusement, n'exerce que peu d'effets bénéfiques sur les complications cardio-métaboliques. Ceci justifie donc les travaux de recherche basés sur une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques du SAOS dans le but de proposer des compléments ou alternatives à ce traitement.

Chez le patient, il a été montré que le SAOS est associé à une moins bonne récupération fonctionnelle suite à un infarctus du myocarde, contribuant au développement de l'insuffisance cardiaque. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans l'aggravation de la cardiopathie ischémique chez les animaux exposés à l'HI.

Des études chez le patient apnéique, le volontaire sain et le rongeur montrent que l'HI induit une activité sympathique soutenue et persistante. L'HI induit également une hyperinsulinémie et une altération de la signalisation insulinique. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que l'hyperactivité sympathique et l'hyperinsulinémie induites par l'HI pourraient participer au remodelage et à la dysfonction contractile post-ischémique chez le patient SAOS.

Nous utiliserons 314 souris qui seront réparties dans différents groupes expérimentaux. Les souris seront soumises à une ischémie myocardique par ligature permanente de l'artère coronaire gauche puis exposées à l'HI ou à la condition normoxie durant 12 semaines. Dans un premier temps, nous évaluerons l'impact de l'HI sur la signalisation insulinique et adrénergique cardiaque, l'activation de GRK2 et le remodelage cardiaque post-ischémique. Dans un second set d'expérience, nous évaluerons le bénéfice d'un inhibiteur de la GRK2, la Paroxétine, sur les signalisations adrénergiques et insuliniques cardiaques, ainsi que sur la fonction cardiaque post-ischémique.

Selon la règle des 3R, nous réduirons le nombre d'animaux utilisés au minimum requis pour répondre à notre question scientifique et remplir les conditions nécessaires pour la réalisation de tests statistiques. Le raffinement consistera à prendre toutes les précautions possibles et nécessaires pour limiter la souffrance animale. Le projet est mis en œuvre dans un établissement utilisateur agréé et tous les personnels impliqués ont des compétences validées pour les manipulations des animaux. Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé et seront observés régulièrement afin d'anticiper l'apparition des points limites fixés. L'administration d'un analgésique est prévue et la méthode de mise à mort des animaux est réglementaire et réalisée sous anesthésie générale. Nous utiliserons également l'échographie transthoracique pour suivre la fonction et le remodelage cardiaque, ce qui nous permettra de limiter le nombre d'animaux et d'utiliser l'animal comme son propre contrôle. Cette étude ayant pour objectif la compréhension de mécanismes physiopathologiques dans un système intégré, nous ne pourrions pas remplacer les expériences sur animal par des expériences *in vitro*.

17425 Les modèles animaux de cancer humain et murin 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.

Le modèle « Hollow Fiber Assay » est un test de l'effet de molécules *in vivo* particulièrement intéressant en oncologie expérimentale permettant de réduire l'écart entre les tests *in vitro* et *in vivo* d'agents anticancéreux. Ce modèle donne des réponses rapides concernant l'efficacité des substances à tester avec évaluation simultanée des paramètres pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et de toxicité préliminaire.

Ce modèle a été développé à partir d'un projet proposé par l'Institut national du cancer américain (NCI) en vue d'établir un test *in vivo* permettant d'analyser la viabilité des cellules tumorales encastrées dans des membranes semi-perméables en réponse à des traitements anticancéreux. Les fibres creuses sont constituées de polyfluorure de vinylidène (PVDF) et ont la forme d'une paille d'un diamètre d'un ou deux millimètre. Ces fibres peuvent être remplies de suspension cellulaire, puis séparées en de multiples segments (de 1 à 2 cm) par thermoscellage. Les pores des fibres ont une taille de 500 kDa qui empêche le passage des cellules dans l'environnement limitrophe, mais permettent aux nutriments, à l'oxygène et aux substances de passer par diffusion. Un avantage important de ce modèle est de pouvoir tester différents types de cellules dans un même animal en utilisant des fibres colorées spécifiques à chaque type cellulaire à tester pouvant aller jusqu'à quatre. Ce modèle permet d'évaluer des composés de chimiothérapies, des petites molécules ou des molécules d'origine biologiques. Les fibres peuvent alors être implantées sous la peau et/ou dans le péritoine des animaux. Dans ces modèles, les fibres sont implantées jusqu'à six jours dans l'animal avant de tester la croissance des cellules permettant une analyse rapide de la réponse aux traitements.

Un autre avantage du modèle de fibres est de permettre aux cellules de s'organiser selon une architecture proche de celle des modèles standards de greffe. En effet, les modèles de tumeurs 3D sont largement étudiés car ils imitent plus étroitement l'architecture de la tumeur en ce qui concerne la morphologie des cellules, la prolifération et la transduction du signal. L'organisation des cellules à l'intérieur des fibres entraîne un gradient d'oxygène et de nutriments amenant à la formation de zones hypoxiques et de nécroses comme observé *in situ*. Le modèle permet d'examiner de larges cohortes de tumeurs dont la croissance et la réponse aux substances sont mesurées en utilisant des tests de viabilité cellulaire *ex vivo* après prélèvement des fibres en fin d'expériences.

Malgré que les cellules soient enfermées dans des fibres et soient isolées du microenvironnement tissulaire, ce type de modèle a pu montrer un caractère prédictif satisfaisant de l'activité de molécules thérapeutiques.

La procédure décrite dans ce projet correspond à la création d'un modèle de tumeurs injectées dans des fibres chez le rongeur. L'objectif de ce projet est de créer et tester différents types de tumeurs chez la souris ou le rat, après administration de cellules tumorales et de tester l'efficacité ou la toxicité de molécules aux propriétés anticancéreuses décrites ou potentielles.

Toutes les mesures de remplacement ont été étudiées afin de limiter le nombre d'animaux entrant en expérimentation. Toutefois, dans certains contextes, la création de ce type de modèle ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives. L'induction de tumeur s'accompagne de modifications physiopathologiques dans un microenvironnement (architecture, métabolisme...) particulier ne pouvant actuellement pas être reproduit *in vitro*, de plus les traitements utilisés subissent toutes les différentes phases incluant administration, distribution, métabolisme et élimination, étapes ne pouvant être reproduites *in vitro*, ces modifications étant nécessaires pour l'étude d'efficacité d'anticancéreux.

L'utilisation de la souris ou du rat comme espèce hôte se justifie par le fait que ces espèces développent rapidement des tumeurs, qu'il s'agit des espèces les mieux décrites dans la littérature, et les données seront comparables avec les modèles standards de greffe.

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 modèle de fibres est idéal pour les chercheurs qui ont besoin de cribler un grand nombre de molécules dans un temps relativement court. En effet, le modèle de fibres permet d'analyser le comportement des cellules en réponse à des traitements dans un délai d'une semaine en comparaison de plusieurs semaines pour les modèles de greffe standards. De plus, le nombre d'animaux par groupe est inférieur à celui d'une étude sur de greffe puisque permettant de tester jusqu'à quatre types cellulaires dans le même animal. Il permet aussi de réduire la quantité nécessaire de substances par test. Ce modèle s'inscrit dès lors dans les recommandations suivant la règle des 3R (réduire, affiner, remplacer).

Le projet consistera à tester des molécules de référence connues pour avoir une activité anticancéreuse mais aussi des molécules non encore décrites. Dans ce cadre, un effectif de 4 à 6 animaux par groupe sera utilisé pour évaluer l'efficacité et la toxicité de molécules. Un test comportera minimum trois groupes (un contrôle, un anticancéreux de référence, et au minimum une dose de substance test), soit un minimum de 12 animaux par test. Ainsi en se basant sur une soixantaine de tests par an durant ce projet, nous estimons à 720 le nombre d'animaux qui seront utilisés par an (i.e. 2160 sur trois ans de projet).

Le raffinement des méthodes expérimentales afin de réduire au maximum la souffrance animale est 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, d'analgésie et de chirurgie (incluant oxygène à concentration ajustable et des tapis chauffants) est défini en accord avec un vétérinaire, afin de réduire au maximum toute douleur ou sensation de souffrance. Il est aussi mis en place un enrichissement complet dans leur hébergement, sous la forme de jouets, litière, objets de nidification, objets à ronger ou mastiquer, présence de congénères....

17426 Les études de la pharmacocinétique sanguine, de la distribution tissulaire et de l'élimination de candidats médicaments biologiques représentent une étape essentielle dans le développement d'un médicament. Ces études, demandées par les conseils scientifiques des entreprises clientes, ont pour but la compréhension et l'analyse du devenir du médicament dans l'organisme, d'évaluer une potentielle accumulation de ce dernier dans les organes et/ou tissus et ainsi de pouvoir mieux appréhender d'éventuels effets indésirables.

Ces études *in vivo* s'inscrivent dans un contexte d'études répétitives car elles seront réalisées selon un même schéma directeur expérimental ayant pour unique objectif l'étude pharmacologique de sélection de candidats médicaments biologiques.

Les variations peuvent porter sur l'espèce animale sélectionnée pour l'évaluation du candidat (rats ou souris), le mode d'administration du candidat, le nombre d'animaux par groupe, le nombre de groupes (différentes doses et/ou différents temps d'euthanasie à analyser)

Ces études *in vivo* sont menées à partir de l'administration de candidats médicaments préalablement marqués par un isotope radioactif de faible énergie afin de tracer et de quantifier ces candidats dans les différents tissus et fluides biologiques d'intérêt. La radioactivité est administrée à des doses ne

présentant aucun effet nocif pour la santé de l'animal. Les différents modes d'administration pouvant être réalisés sont les suivants : voie Intraveineuse, voie sous-cutanée, voie intramusculaire, voie intrapéritonéale, voie orale « gavage », voie intra-articulaire au niveau du genou, voie intrathécale et voie intravésicale

L'évaluation de la distribution tissulaire et sanguine de 15 à 20 molécules médicaments sera réalisée annuellement, nécessitant un nombre d'animaux total pouvant varier de 180 à 960 rats et/ou souris. Ainsi sur 5 ans, le nombre total d'animaux nécessaires pour l'évaluation de 75 à 100 molécules est de 900 à 4800 rats et souris confondus.

L'ensemble de ces expérimentations *in vivo* respecte la règle des 3R, comme mentionnée dans la directive européenne 2010/63/UE. En effet, les procédures utilisées ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives *in vitro* n'impliquant pas des animaux vivants. La précision et la reproductibilité de la méthode de détection radioactive permettent de réduire le nombre d'animaux par groupe tout en prenant en compte la variabilité interindividuelle. Aucun test statistique n'est envisagé, il sera uniquement prévu de calculer le coefficient de variation sur des groupes de 3 à 6 animaux.

Le respect du bien-être animal passe par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi quotidien des animaux, des méthodes utilisées visant à réduire le plus possible toute forme de douleur, souffrance ou stress de l'animal ainsi que l'instauration de points limites pertinents et précoces. Ainsi, afin de réduire la douleur et le stress, une anesthésie gazeuse par isoflurane sera réalisée pour certains modes d'administration (IV au niveau du sinus rétro-orbitale, injection intra-articulaire, intrathécale et intravésicale) et certaines techniques de prélèvements sanguins (prélèvement à la veine submandibulaire ou au niveau du sinus rétro-orbitaire). Une analgésie par buprénorphine en voie sous-cutanée sera également mise en oeuvre pour les animaux administrés par voie intrathécale et intravésicale.

Enfin, à l'exception des animaux maintenus en cage à métabolisme (hébergement individuel), les animaux sont hébergés par groupe de 3 à 5 animaux dans des cages en plastique transparent et le milieu est enrichi avec du papier accordéon pour faciliter la nidation, des tunnels rouges et des bâtonnets torsadés (rat uniquement). Ils sont maintenus dans un cycle jour/nuit de 10h/14h avec un accès à l'eau et la nourriture sans restriction.

17427 Le carcinome hépatocellulaire (CHC= cancer du foie) est la seconde cause de mortalité par cancer dans le monde, et dont l'étiologie évolue dans les pays occidentaux. En effet, dû à des régimes alimentaires de plus en plus gras et sucrés, le nombre de cancer du foie se développant sur syndrome métabolique (SM) est en perpétuelle augmentation. La manifestation hépatique du SM s'appelle la NAFLD (= la maladie du foie « gras ») (Non-alcoholic fatty liver disease). Cette montée de la prévalence du SM transforme le cancer du foie sur NAFLD (= foie « gras ») en un problème de santé publique de premier ordre. En 2020, la maladie du foie « gras » deviendra la première cause de transplantation hépatique.

À ce jour, il n'existe aucun traitement efficace sur le long terme dans le cancer du foie. Le développement d'un modèle représentatif de la cause principale du cancer du foie (i.e. la maladie du foie « gras ») pour tester de nouvelles molécules semble pertinent et primordial pour les patients.

Bien que le cancer sur foie « gras » devienne un problème de santé publique, il existe peu de modèles animaux cliniquement pertinents. Certaines équipes ont pu établir des modèles murins permettant de décrire les anomalies histologiques, métaboliques ou génétiques, mais jamais les trois en même temps. Toutefois, ces modèles restent à ce jour peu reproductibles. De plus, dans le développement des médicaments anti-cancéreux, l'utilisation d'animaux est aujourd'hui indispensable. Notre projet consiste à établir un nouveau modèle reproductible et cliniquement pertinent pour l'évaluation de nouvelles molécules anti-tumorales dans le traitement du CHC sur foie NAFLD.

Ce projet propose d'utiliser un modèle de souris transgénique (ASV-B) développant un cancer du foie sur foie sain, mimant parfaitement la maladie qui se développe chez le patient. À partir de ces animaux, et par l'utilisation de régimes alimentaires spécifiques, nous allons tenter de développer un modèle de souris développant un cancer du foie sur foie « gras ». Ce modèle permettra de comparer à des stades

de développement égaux les caractéristiques du cancer du foie plus ou moins maladie du foie « gras », et ce d'un point de vue protéique, histologique et génétique. Il est important d'inclure également des animaux ne développant pas de cancer du foie pour montrer que les régimes spécifiques utilisés peuvent induire des foies « gras » même sans cancer du foie concomitant.

Notre projet aura lieu en deux phases :

- Afin de réduire le nombre d'animaux, tout en étant statistiquement valide, nous allons d'abord comparer les 4 régimes alimentaires les plus décrits dans la littérature au régime classique afin d'identifier lequel de ces régimes permet le développement de la maladie du foie « gras » dans le tissu hépatique sain ou développant un cancer du foie. Cette étape nécessite 50 animaux développant un cancer du foie et 25 animaux sains d'une génétique identique.

- Ensuite, nous comparerons le régime alimentaire identifié comme étant celui le plus proche du SM en pathologie humaine avec le régime classique (groupe contrôle). Pour ce faire, le nombre d'animaux dans le groupe contrôle et dans le groupe « aliment spécifique » sera augmenté, afin de permettre des mises à mort intermédiaires. Ces étapes intermédiaires permettront de caractériser au cours du temps le développement de la maladie du foie « gras » d'un point de vue histologique et par imagerie. Pour cette partie nous aurons besoin de 60 animaux développant un cancer du foie et 60 animaux sains d'une génétique identique. En cas de succès, nous souhaitons reproduire cette expérimentation deux fois, soit un total de 240 animaux, afin de confirmer la reproductibilité du modèle, qui est un facteur important.

Ainsi, pour la totalité du projet, nous utiliserons :

- 195 animaux répartis comme suit : 75 animaux (phase I) + 120 animaux en cas d'échec de la phase II ou 315 animaux répartis comme suit : 75 animaux (phase I) + 2 fois 120 animaux en cas de succès de la phase II

Le projet n'inclut pas de procédures douloureuses et les animaux seront observés 5 fois par semaine. Toutefois, la procédure 3 consiste en un prélèvement de sang de classe « sans réveil ». Pour éviter toute souffrance, cette procédure est réalisée sous analgésie et anesthésie. Différents points limites seront particulièrement surveillés tels que la perte de poids (qui ne sera jamais pris en compte individuellement dans la mesure où l'accroissement du volume hépatique peut provoquer une légère prise de poids), le gonflement de l'abdomen (signe de développement tumoral trop important) et la survenue d'une gêne pour se déplacer (signe de douleur possible au niveau hépatique). Le comportement et l'apparence physique feront aussi l'objet d'observations. Les dispositions retenues pour stopper ou atténuer les problèmes liés à l'apparition de points limites seront prises dès constatation. Un tableau listant les points, les scores associés à ces points et les dispositions à prendre sera établi (Annexe I). Les souris seront hébergées en armoire ventilée avec une alimentation classique et/ou enrichie en protéines et lipides et de l'eau à volonté. Elles disposeront d'un enrichissement leur permettant nidification et fouissage. Cycles jour/nuit : 12/12h, Température : 20°/24°C.

17428 L'encéphalite auto-immune est une maladie neurologique rare caractérisée par la présence d'auto-anticorps (autoAc) dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien des patients. Des preuves croissantes indiquent que les autoAc ont un rôle pathologique direct dans la maladie, c'est-à-dire que la liaison de l'autoAc à sa protéine cible perturbe la fonction. Ce projet a pour objectif de définir le rôle des autoAc dans la physiopathologie d'un sous-groupe d'encéphalite auto-immune impliquant des hommes entre 55 et 75 ans atteints d'amnésie et de crises d'épilepsie. L'autoAc retrouvé dans ce groupe de patient se lie à une protéine exprimée par les neurones inhibiteurs de l'hippocampe, une région nécessaire à la formation des souvenirs. En particulier, cette protéine est détectable à la périphérie des synapses inhibitrices, les points de communications par lesquels les neurones transmettent un signal d'inhibition. Par ailleurs, cette protéine est nécessaire pour recruter à la membrane neuronale les canaux ioniques, d'important régulateurs de l'excitabilité des neurones.

Par conséquent, il apparaît essentiel de vérifier que les autoAc retrouvés chez les patients sont responsables des troubles de mémoire, et qu'ils perturbent le fonctionnement des neurones inhibiteurs de l'hippocampe via l'altération du recrutement des canaux ioniques et/ou la stabilité des synapses inhibitrices.

Pour ce faire, des pompes seront placées sous la peau du dos de souris adultes et connectées à des canules implantées dans les ventricules cérébraux, région péri-hippocampique. Ces pompes délivreront pendant 14 jours une solution contenant soit des anticorps provenant de patients, soit des anticorps contrôles provenant de sujets sains.

La mémoire sera évaluée sur une première série de souris à l'aide du test de reconnaissance du nouvel objet sur une période de 30 jours. Les résultats obtenus permettront de valider le modèle, de déterminer le jour où les anticorps ont un impact maximal sur la mémoire (jour max) et d'observer une récupération éventuelle après arrêt de l'infusion. Ceci permettra de démontrer que l'infusion des anticorps suffit à provoquer les troubles de mémoire, et qu'ils sont la cause principale de la maladie.

Ensuite, une deuxième série de souris infusées sera dédiée à l'analyse au jour max des mécanismes moléculaires mis en jeu : histologie (densité de marquage des récepteurs GABAA et gephyrin), biochimie (niveau d'expression et d'activité des canaux ioniques) et électrophysiologie (excitabilité neuronale).

Enfin, seulement si les autoAc impactent l'expression ou l'activité des canaux ioniques, la procédure d'infusion sera appliquée à des souris transgéniques (série 3). Son utilisation permet d'identifier les neurones inhibiteurs et de distinguer les formes membranaires des canaux ioniques. Ces conditions sont requises pour l'étude *ex vivo* de l'impact des autoAc sur la dynamique membranaire des canaux ioniques dans les neurones inhibiteurs de l'hippocampe.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R : Raffinement, Réduction et Remplacement.

Toute souffrance animale sera évitée. Pour cela, des analgésiques adaptés seront administrés en soins per et post opératoires et les animaux seront surveillés 5 jours par semaine. Une grille de score de bien-être sera utilisée, et des points limites seront anticipés en fonction du score obtenu. Enfin, le milieu sera enrichi (éléments de nidification, abri avec roue) pour compenser le maintien en cage individuelle.

Au total, 78 souris seront nécessaires pour mener à bien ce projet. Le nombre d'animaux a été calculé par rapport à une approche statistique très fine permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en gardant une puissance statistique importante. Par ailleurs, le nombre d'animaux sera limité en procédant par étapes. En effet, si lors du test de la mémoire (série 1, 24 souris) aucun effet des autoAc de patients n'est observé, le projet sera arrêté. De la même façon, les expériences prévues en série 3 (18 souris) ne seront réalisées que si des altérations moléculaires sont observées dans la série 2 (36 souris).

Ce modèle animal, conçu de manière à délivrer les anticorps dans la région péri-hippocampique sur une longue période, est le meilleur modèle pour mimer la maladie et ne peut pas être remplacé par une autre approche expérimentale. De plus, il a été privilégié car contrairement aux approches *in vitro*, il prend en compte la complexité des régulations physiologiques impliquées dans la mémoire.

En conclusion, ce projet permettra de confirmer le rôle des autoAc dans le développement des troubles de mémoire chez les patients souffrant d'encéphalite. Il permettra de comprendre les mécanismes moléculaires de la maladie pour envisager dans le futur de nouvelles pistes thérapeutiques, un enjeu important étant donné que les traitements immunosuppresseurs ne sont que partiellement efficaces.

17429 L'initiation des cancers du poumon est très fréquemment associée à des mutations de Kras. Face à ces mutations, les cellules deviennent précancéreuses, elles développent une réponse de protection visant à limiter leur expansion. Ce processus appelé « Senescence » conduit les cellules précancéreuses à limiter leur expansion, mais également à produire et sécréter de nombreuses molécules dont les rôles bénéfiques ou néfastes restent encore mal compris. Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses, le développement de médicaments appelées « sénomorphiques » vise à bloquer spécifiquement les molécules aux effets délétères tout en conservant les effets des molécules bénéfiques produites par les cellules précancéreuses sénescents.

Ce projet vise à mieux comprendre le rôle de plusieurs molécules produites par les cellules pré-tumorales pulmonaires afin d'identifier les sénomorphiques les plus adaptés pour traiter les cancers du poumon. 6 molécules seront testées dans un modèle murin prédisposant à l'apparition de lésions

précancéreuses du poumon. Une approche induisant simultanément les mutations Kras et le blocage de 6 facteurs d'intérêts sera réalisée par une infection virale des voies respiratoires chez la souris.

Des travaux préliminaires seront réalisés sur un nombre réduit d'animaux afin de valider l'efficacité et la reproductibilité des approches d'infections virales ciblant les poumons de ces animaux. Si concluantes, ces approches seront ensuite utilisées pour étudier un groupe plus important d'animaux afin de mieux comprendre les effets des molécules sélectionnées : 1- à court terme (impact sur l'initiation tumorale) et, 2- à long terme (conséquences sur l'agressivité des tumeurs développées). Dans son ensemble ce projet et les différentes procédures qu'il implique ne devrait pas nécessiter plus de 180 souris.

En raison de la nature complexe de ces recherches qui visent à comprendre la tumorigénèse au sein du poumon, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de modèles murins par des outils cellulaires. Néanmoins, l'efficacité des 6 virus ciblant nos molécules d'intérêts sera systématiquement validé sur des cellules avant toute utilisation chez la souris pour limiter le nombre et la souffrance inutile d'animaux. Aucune cohorte d'analyse ne seront lancées avant la validation technique de l'efficacité de nos approches via des études préliminaires réalisées sur un nombre limité de souris. Nous mettrons en place une surveillance adaptée et individuelle des animaux afin d'éviter que nos modes opératoires, d'infections intratrachéales et intranasales bien que maîtrisés et réalisés sous anesthésie, n'entraînent pas de complications ou des conséquences sur le bien-être des souris. Le suivi individuel régulier de chaque souris permettra d'identifier l'apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance des animaux étudiés (prostration, perte de poids, gonflement du cou, problèmes respiratoires) qui entraînerait une fin d'expérimentation immédiate. Un suivi longitudinal par imagerie à rayon X, réalisé également sous anesthésie, permettra de quantifier précisément la perte des capacités pulmonaires associées au développement de lésions et d'éviter le maintien inutile d'animaux en insuffisance respiratoire. Dans leur ensemble, ces approches devraient réduire le nombre d'animaux utilisé et éviter toute souffrance inutile.

17430 Les maladies chroniques du foie d'origine non alcoolique sont caractérisées par une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de graisses dans le foie, en absence de toute consommation d'alcool ou d'hépatite liée à une infection virale ou à une maladie auto-immune. La prévalence est de 25% dans la population totale mondiale. Elles sont, dans la majorité des cas, considérées comme une maladie bénigne du foie. Cependant certains patients développent une manifestation plus sévère, la stéatohépatite non alcoolique (NASH) qui se caractérise par une accumulation d'acides gras dans les cellules du foie, une inflammation et une fibrose (destruction progressive du tissu). Dans les cas extrêmes, la NASH peut évoluer vers une cirrhose voire un cancer du foie. La mortalité chez les patients atteints de NASH est d'environ 7% et peut atteindre 36% chez des personnes souffrant par ailleurs de maladies cardio-vasculaires. Actuellement, seules des modifications de comportement alimentaire et physique réduisent l'impact de ces pathologies chroniques du foie. Il n'existe aucun traitement thérapeutique dans cette indication précise.

L'objectif de ce projet est d'identifier dans des modèles murins de NASH des biomarqueurs d'imagerie pertinents et quantitatifs, utilisés en clinique humaine, pour suivre l'évolution de la maladie et avoir à disposition des critères d'efficacité de futures pistes thérapeutiques. A ce jour, il n'existe pas de méthodes *in vitro* substitutives pour nous permettre d'évaluer l'effet d'un traitement dans la stéatohépatite. Le recours à des modèles animaux est nécessaire pour pouvoir intégrer toutes les interactions hormonales, inflammatoires et neuronales impliqués dans la pathologie hépatique. Nous induirons l'apparition progressive d'une NASH chez des rongeurs par différents régimes nutritionnels en modifiant la composition des croquettes alimentaires (régime hypercalorique et/ou déficient en acides aminés essentiels). Deux types de régimes alimentaires induisant des cinétiques différentes d'apparition de la NASH chez la souris seront ainsi étudiés. Ces régimes alimentaires n'induisent pas de modification comportementale ou physiologique nette sur les durées qui seront envisagées dans ce projet.

Nous mesurerons le degré de la stéatohépatite et son évolution vers des complications plus sévères grâce à des techniques d'imagerie dite « non invasives » telles que l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la tomographie par émissions de positons (TEP), techniques utilisées

également chez l'humain. Nous chercherons ensuite à confronter les résultats obtenus aux paramètres histologiques et métaboliques (charge et teneur en acides gras).

Les modèles de NASH sont très bien décrits chez la souris. Les souris sont utilisées à l'âge adulte. Elles sont hébergées en groupes sociaux dans des cages enrichies de coton et de litière adaptée. Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que le fouissage, l'exploration ou encore la nidification. Elles feront, de plus, l'objet d'une observation visuelle, comportementale quotidienne, ainsi que d'un suivi du poids corporel régulier. L'ensemble des examens d'imagerie qui sont envisagés sont indolores et non-invasifs et permettent donc un suivi longitudinal de la progression de la maladie chez l'animal ; réduisant de fait le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation du projet. Durant l'acquisition des données, l'animal est anesthésié et les constantes physiologiques (température rectale, respiration) sont monitorées afin de prévenir la survenue d'évènements inattendus au cours de l'expérimentation. A la fin de l'examen, l'animal réintègre sa cage dès son réveil. Dans le cadre de notre approche de recherche de biomarqueurs d'imagerie pertinents pour l'approche thérapeutique, on estime à n=202 le nombre de souris qui seront utilisées sur les 5 ans du projet.

17431 Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est une maladie respiratoire fréquente, qui touche 10 à 15% de la population et constitue un problème majeur de santé publique, notamment à cause du risque cardiovasculaire (hypertension, maladie coronarienne et insuffisance cardiaque) et métabolique (résistance à l'insuline et diabète de type 2) associé. Parmi les conséquences du SAOS, la répétition d'obstructions partielles ou complètes des voies aériennes supérieures induit une hypoxie intermittente (HI) chronique, reconnue comme étant le facteur le plus délétère en termes de complications cardiométaboliques. A ce jour, le traitement de référence est l'application d'une pression positive continue pendant le sommeil, qui, malheureusement, n'exerce que peu d'effets bénéfiques sur les complications cardio-métaboliques. Ceci justifie donc les travaux de recherche basés sur une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques du SAOS dans le but de proposer des compléments ou alternatives à ce traitement.

Chez le patient, il a été montré que le SAOS est associé à une moins bonne récupération fonctionnelle suite à un infarctus du myocarde, contribuant au développement de l'insuffisance cardiaque. Au laboratoire, grâce à notre modèle d'HI chez le rongeur, nous avons confirmé l'aggravation de la cardiopathie ischémique chez les animaux exposés à l'HI. L'objectif de cette étude est désormais de poursuivre ces travaux et de mettre en évidence les mécanismes précis impliqués.

Des études chez le patient apnéique, le volontaire sain et le rongeur montrent que l'HI induit une activité sympathique soutenue et persistante. L'HI induit également une altération de la sensibilité à l'insuline systémique, une hyperinsulinémie, ainsi qu'une altération de la signalisation insulinaire. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que l'hyperactivité sympathique et l'hyperinsulinémie induites par l'HI pourraient conjointement favoriser la désensibilisation des voies adrénergique et insulinaire cardiaques et participer au remodelage et à la dysfonction contractile post-ischémique chez le patient SAOS.

Nous utiliserons 314 souris qui seront répartis dans différents groupes expérimentaux. Les souris seront soumises à une ischémie myocardique par ligature permanente de l'artère coronaire gauche puis exposées à l'HI ou à la condition normoxie durant 12 semaines. Dans un premier temps, nous évaluerons l'impact de l'HI sur la signalisation insulinaire et adrénergique cardiaque, l'activation de GRK2 et le remodelage cardiaque post-ischémique. Dans un second set d'expérience, nous évaluerons le bénéfice d'un inhibiteur de la GRK2, la Paroxétine, sur les signalisations adrénergiques et insulinaires cardiaques, ainsi que sur la fonction cardiaque post-ischémique.

Selon la règle des 3R, nous réduirons le nombre d'animaux utilisés au minimum requis pour répondre à notre question scientifique et remplir les conditions nécessaires pour la réalisation de tests statistiques. Le raffinement consistera à prendre toutes les précautions possibles et nécessaires pour limiter la souffrance animale. Le projet est mis en œuvre dans un établissement utilisateur agréé et tous les personnels impliqués ont des compétences validées pour les manipulations des animaux. Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé et seront observés régulièrement afin d'anticiper l'apparition des points limites fixés. L'administration d'un analgésique est prévue et la méthode de mise à mort des animaux est réglementaire et réalisée sous anesthésie générale. Nous

utiliserons également l'échographie transthoracique pour suivre la fonction et le remodelage cardiaque, ce qui nous permettra de limiter le nombre d'animaux et d'utiliser l'animal comme son propre contrôle. Cette étude ayant pour objectif la compréhension de mécanismes physiopathologiques dans un système intégré, nous ne pourrons pas remplacer les expériences sur animal par des expériences *in vitro*.

Au total, 314 animaux seront inclus dans cette procédure d'imagerie échographique qui sera réalisée sur animal anesthésié.

17432 La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies rares. Dans la population caucasienne, la maladie représente environ une naissance sur 4500 et plus de 7000 patients sont atteints par la maladie en France en 2020 (registre de la mucoviscidose 2017). Il s'agit d'une maladie mortelle qui touche principalement les poumons, le pancréas, l'intestin, le foie, les glandes sudoripares et qui s'exprime dès la petite enfance avec une prise en charge lourde et onéreuse. La mucoviscidose est une maladie génétique due aux mutations dans un gène qui code la protéine appelée CFTR pour Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator. L'un des rôles principaux de CFTR est de former un canal au travers de la membrane de certaines cellules situées notamment au niveau des muqueuses intestinale et respiratoire. Les mutations de CFTR perturbent les échanges d'ions et d'eau au travers des muqueuses d'où une inflammation et un épaississement du mucus qui entraînent les symptômes de la mucoviscidose notamment au niveau pulmonaire, pancréatique et intestinal.

La mutation la plus fréquente est la délétion d'un acide aminé en position 508 (mutation notée F508del dans le projet). Elle est présente chez 80% des patients en France et est à l'origine d'un tableau clinique sévère. Les progrès importants dans la prise en charge des symptômes de la maladie et les possibilités de transplantations d'organes ont conduit à une augmentation importante de l'espérance de vie chez ces patients qui est passé de 7 ans dans les années 60 à plus 50 ans aujourd'hui mais au prix d'une prise en charge extrêmement lourde et contraignante. Toutefois les formes graves entraînent toujours une mortalité précoce (L'âge médian de décès était de 33.8 ans en 2017 (registre de la mucoviscidose 2017)). Les premiers traitements médicamenteux sont apparus récemment. Les patients porteurs de certaines mutations répondent très bien à ces nouveaux traitements alors que les porteurs de la mutation F508del répondent assez mal. C'est pourquoi d'autres molécules sont à l'étude.

Ce projet vise à étudier l'efficacité de nouvelles molécules candidates sur des modèles de souris qui ont été modifiées pour que s'expriment ou non les protéines d'intérêt c'est-à-dire CFTR, CFTR avec la mutation F508del, ou que ne s'exprime pas du tout la protéine CFTR.

Pour cela, des tests seront utilisés pour rechercher l'impact de ces molécules sur la correction des anomalies dues à la mucoviscidose chez la souris sur les mouvements ioniques au travers des cellules de la muqueuse nasale, sur les altérations de sécrétion salivaire et les anomalies observées au niveau de l'émail dentaire ou des os. Aucune méthode *in vitro* ne permet d'évaluer l'efficacité de molécules candidates sur ces tissus tout en tenant compte de la complexité des structures tissulaires et notamment de l'accès de la molécule au site d'action après administration générale. Les différentes procédures seront menées en conformité avec la règle des « 3R » (Réduire, raffiner, remplacer).

Les molécules testées ou leurs combinaisons seront préalablement validées via des études préliminaires sur des cultures cellulaires de manière à ne retenir que les combinaisons potentiellement efficaces et à réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Les souris mucoviscidosiques reçoivent dans l'eau de boisson un laxatif ce qui permet d'éviter la mortalité par obstruction intestinale. Ainsi traitée, il a été montré que les souris peuvent atteindre des âges très avancés sans altération visible de leur bien-être.

L'enrichissement du milieu d'hébergement sera assuré par ajout dans la cage de maisonnettes, de bâtonnets à ronger et de coton permettant aux souris de réaliser un nid et de s'y enfouir. La taille des groupes a été déterminée de manière à ce que l'on puisse avoir des résultats exploitables avec un minimum d'animaux utilisés. Une souris pourra subir plusieurs procédures ce qui permet réduire le nombre d'animaux utilisés. Cela est possible car certaines de nos procédures sont non invasives et non douloureuses et ne nécessitent une anesthésie que pour garantir l'immobilité de l'animal au cours de l'enregistrement des mouvements ioniques au travers des membranes et/ou pour permettre des

injections au niveau des glandes salivaires et permettre ensuite le recueil de la salive. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux souris, leur état fera l'objet d'une surveillance journalière. Un gel ophtalmique (Ocrigel) sera appliqué sur les yeux des souris lors des anesthésies pour éviter l'apparition d'une sécheresse oculaire.

Enfin si les points limites préalablement établis sont atteints, l'animal sera euthanasié de façon anticipée afin d'éviter toute souffrance.

Pour chaque molécule testée, ou combinaison de molécule, le nombre d'animaux utilisés sera au maximum de 60. Si on envisage de tester 10 molécules ou combinaisons de molécules sur une période de 5 ans, le nombre total d'animaux prévus dans ce projet sera au maximum de 600 souris.

Nous espérons ainsi identifier des combinaisons de molécules qui permettront ainsi de corriger significativement les anomalies dues au défaut de CFTR et de comparer les combinaisons les unes par rapport aux autres pour optimiser les chances d'avoir un effet significatif sur l'ensemble des symptômes liés à la mucoviscidose lorsqu'elles seront testées chez l'homme.

17433 Les parasites imposent des coûts à leurs hôtes. En réponse, les hôtes possèdent un ensemble de réponses possibles afin de réduire le risque de transmission et le coût de l'infection. Ces réponses sont à la fois comportementales (évitement des congénères parasités) et physiologiques (réponse immunitaire). L'environnement infectieux où l'individu évolue peut affecter l'expression de ces réponses adaptatives. Lorsqu'un individu perçoit un risque infectieux important on pourrait s'attendre à ce qu'il sur-exprime le comportement d'évitement des congénères et le niveau des défenses immunitaires constitutives, en tous cas pour les espèces exprimant des liens sociaux. Cela a très peu été abordé chez des vertébrés dans un contexte évolutionniste.

L'expérience envisagée ici vise à tester cette hypothèse sur un modèle rongeur (souris swiss). Des souris femelles seront réparties dans 5 groupes expérimentaux avec une ou 4 congénères, et seront mises en reproduction ensuite. Au total l'expérience impliquera 190 femelles et 50 mâles. Leurs descendants, par définition en nombre inconnus seront concernés par la fin de l'expérience.

En résumé, nous confronterons des femelles focales (50 au total) à d'autres souris femelles dont la réponse inflammatoire aura été stimulée ou non par l'injection de LPS afin de simuler pour les souris focales un environnement infectieux plus ou moins sévère selon le nombre de congénères traitées au LPS. Les souris focales seront filmées et leur comportement (évitement des congénères, activité, ...) sera analysé par examen des films. Après 9 jours d'exposition à ces conditions, les souris focales seront l'objet d'une stimulation de l'inflammation et d'un prélèvement sanguin pour quantifier certains effecteurs de l'inflammation (cytokines pro- et anti-inflammatoires), et chacune d'entre-elles sera ensuite placée avec un mâle. Les variables associées à la reproduction (délai d'apparition du bouchon vaginal, nombre des jeunes produits à la naissance et au sevrage, croissance des jeunes) seront mesurées.

Dans la mesure où l'expérience inclut des mesures de comportement des animaux, il n'est évidemment pas possible de remplacer le modèle *in vivo* par un modèle *in vitro*. Nous réduisons le nombre d'animaux avec seulement 5 (voire 2) individus par cage et utiliserons 10 réplicats par traitement ce qui représente un nombre plancher si l'on veut conserver une certaine validité statistique dans l'analyse de phénomènes sans doute subtils. En ce qui concerne le bien-être des animaux, ceux-ci ne seront pas hébergés seuls (mais toujours avec un congénère au minimum) et leur environnement sera enrichi de plusieurs « abris ». Les doses de LPS injectées seront telles qu'elles induiront un inconfort restreint et transitoire. Les souris focales ou non seront suivies quotidiennement afin de vérifier leur état de santé et leur bien-être. Si des signes de mal-être imprévus sont perçus (perte de poids durable, changement de comportement avec prostration durable) les animaux seront euthanasiés par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane.

17434 Les différents projets de recherche de l'équipe portent sur la compréhension des mécanismes à l'origine de la progression des gliomes de haut grade, ainsi que dans l'évaluation de et/ou la caractérisation de nouvelles stratégies thérapeutiques. De plus, les effets émotionnels et cognitifs ainsi que neurobiologiques du cancer et/ou de ses traitements sont également étudiés.

Ces différents projets nécessitent l'utilisation de modèles murins qui impliquent l'implantation de cellules tumorales au niveau sous-cutané, mammaire ou cérébral, ou l'injection de sang et de substances dans l'espace sous-arachnoïdien, ou des injections intrapéritonéales, intraveineuses, intramusculaires, intracardiaques, intranasales ou orales de traitements, ainsi que l'analyse de leurs conséquences ou de celles des thérapeutiques potentielles sur les fonctions cérébrales. Ces dernières sont évaluées grâce à différents tests comportementaux mesurant les capacités d'apprentissage, la mémoire, la flexibilité comportementale, l'anxiété, la résignation, l'activité spontanée. De plus, les mécanismes neurobiologiques à l'origine des troubles potentiels mis en évidence sont étudiés grâce à des marquages histologiques, des études biochimiques et de biologie moléculaire réalisés sur les cerveaux des souris utilisées pour les évaluations comportementales.

Toutes ces procédures nécessitent des techniques qui sont utilisées depuis des années dans le laboratoire et qui sont réalisées par du personnel qualifié et expérimenté. L'équipe est actuellement composée de 3 chercheurs/enseignants-chercheurs, 1 ingénieure, 3 post-doctorants/contractuels, 4 doctorants ayant une activité en expérimentation animale et ayant validé les formations réglementaires requises et dont les compétences en expérimentation animale sont validées. Ces membres de l'équipe sont amenés à accueillir et encadrer chaque année de nouveaux personnels comme des étudiants en thèse et/ou en master, ainsi que des post-doctorants et contractuels devant travailler sur les différents projets dans le cadre de nouveaux contrats impliquant des procédures expérimentales sur animaux. Il est donc nécessaire de former ces nouveaux arrivants et/ou de vérifier leurs compétences afin qu'ils puissent exercer les fonctions d'application des procédures expérimentales sur animaux en fonction des projets mis en oeuvre. Ces formations seront supervisées par un tuteur de l'équipe présentant les qualifications réglementaires et l'expérience adéquates jusqu'à ce que les nouveaux arrivants aient démontré qu'ils possèdent les compétences requises et que leurs compétences soient validées (en accord avec la réglementation européenne).

Afin de former ces nouveaux arrivants et/ou de vérifier qu'ils maîtrisent les gestes techniques relatifs à l'utilisation d'animaux, des lots de souris sont nécessaires. Durant tout le projet, la règle des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement) sera respectée. Réduction : Afin de respecter la règle des 3R, le nombre de souris utilisées dans les projets de l'équipe sera réduit en utilisant des souris utilisées dans des projets déjà finalisés. Il s'agira de souris anciens reproducteurs qui ont servi à entretenir la reproduction des lignées de souris transgéniques de l'équipe. Un nombre de 340 souris par an sera nécessaire au maximum : 120 pour les administrations de traitements (voie sous-cutanée, intrapéritonéale, intranasale, intramusculaire, orale, intraveineuse, intracardiaque) et prélèvement sanguins; 40 pour les implantations de cellules tumorales et l'exérèse tumorale ; 30 pour les modèles d'hémorragie cérébrale par injection intracisternale; 40 pour les injections intracérébrales; 40 pour les tests comportementaux évaluant l'apprentissage, la mémoire, l'anxiété ; 40 pour des prélèvements de sang ; 30 pour les perfusions intracardiaques. Donc 1700 animaux seront utilisés au maximum pour les 5 ans du projet.

Remplacement : Il est indispensable d'utiliser la souris comme modèle de greffe tumorale, d'hémorragie cérébrale, d'exérèse de tumeur ou pour les administrations de traitements anticancéreux afin de réaliser des tests comportementaux, et de disposer d'un environnement cérébral assez proche de la pathologie humaine pour bien comprendre les mécanismes neurobiologiques et pour tester différentes méthodes et molécules thérapeutiques dans un contexte intégré. Raffinement : Durant toutes les expérimentations, une prise en charge de la douleur potentielle sera faite avec l'utilisation d'analgésiques lors des implantations cérébrales de cellules tumorales, l'exérèse tumorale ou de la réalisation des modèles d'hémorragie cérébrale comprenant différents types d'injection. 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.

17435 La sérotonine (5-HT) est un neurotransmetteur, produit par les neurones du système nerveux central (SNC) pour communiquer avec d'autres cellules, y compris d'autres neurones. C'est aussi 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 SNC et SP sont au cœur de mécanismes inflammatoires impliqués dans des désordres neurologiques comme la Sclérose En Plaques (SEP). 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 pour ces maladies. La 5-HT agit sur sept classes de récepteurs, par des mécanismes encore mal compris.

Ce projet d'imagerie fait partie d'une étude plus large qui 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 analogue actif de la 5-HT qui est spécifique de ce récepteur. Nous utiliserons ce ligand pour étudier, dans des modèles murins de neuroinflammation (i) l'implication du 5-HT7R dans les mécanismes inflammatoires engagés par le système sérotoninergique et (ii) les effets du ligand et son potentiel thérapeutique. A plus long terme, nos objectifs sont d'élaborer une nouvelle stratégie thérapeutique, plus ciblée et efficace, pour le traitement des maladies neuroinflammatoires.

L'étude chez l'animal est indispensable, compte tenu de la complexité des interactions cellulaires et moléculaires qui sont impliquées, mais aussi en raison de notre objectif thérapeutique. La souris est un modèle de choix, car elle possède également le récepteur 5-HT7 et car les mécanismes inflammatoires responsables des lésions neurologiques sont très similaires à ceux présents chez l'Homme.

Notre projet vient en complément d'un protocole en cours chez nos collaborateurs. Il a pour objectif d'évaluer, par la méthode d'imagerie en tomographie de positons (TEP), la neuroinflammation dans différents groupes expérimentaux exprimant ou non le récepteur 5-HT7 et recevant ou non le ligand synthétique. L'imagerie sera réalisée chez des animaux provenant du laboratoire dans lequel est réalisé le projet. Au maximum 120 souris seront utilisées dans ce projet d'imagerie. Elles feront l'objet d'un suivi strict basé sur un score adapté au modèle. Les points limites seront établis en amont afin d'éviter l'état de souffrance des animaux. Une attention particulière sera accordée au respect de la règle des 3R)

- Réduire : les groupes expérimentaux contiendront 10 souris chacun, ce qui est le minimum compte tenu de la variabilité observée au sein du même groupe.

- Remplacer : Compte tenu de la complexité des interactions cellulaires et moléculaires à l'origine des mécanismes inflammatoires, l'approche *in vivo* est une nécessité afin d'appréhender ces mécanismes dans leur ensemble.

- Raffiner : tout sera mis en oeuvre pour maximiser le bien-être animal. Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau dans leur cage d'hébergement, Ils seront en présence d'un enrichissement comprenant un bâton à ronger, un papier absorbant et un tunnel.

En effet l'aspect général extérieur de l'animal (posture, pelage, démarche, faciès, yeux) sera observé tous les jours. Durant la procédure d'imagerie, nous respecterons le protocole habituel (température corporelle, fréquence cardiaque).

17436 L'inflammation est un ensemble de mécanismes de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères (agent infectieux, substance étrangère, ...). Au cours de l'inflammation, de nombreuses molécules informationnelles appelées cytokines sont produites pour aider l'organisme à assurer sa défense. Pour mimer cette réaction, un anticorps dirigé contre le marqueur cellulaire CD3 ϵ appelé anti-CD3 ϵ peut être administré pour stimuler la production de cytokines. Les cytokines produites suite à cette stimulation peuvent avoir une action pro-inflammatoire (activer l'inflammation) comme l'IL-1, IL-2, IL-6, TNF, IFN- γ , IL-12 ou anti-inflammatoire (ralentir ou éteindre l'inflammation) comme l'IL-4, IL-5, IL-10 ou IL-13. En temps normal les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires agissent de concert pour détruire la substance étrangère. Cependant, dans certains cas, l'organisme produit des molécules contre lui-même, dans ce contexte, il s'agit de réactions auto-immunes mettant en jeu les cytokines de la famille de l'IL-17 (IL-17A, F, et IL-22). L'administration d'anti-CD3 ϵ va permettre d'induire une réaction inflammatoire en chaîne conduisant à une réponse immunitaire accrue. L'activation cellulaire va conduire à l'emballement de

tout le système immunitaire et une production massive de cytokines, appelée « cytokine storm ou orage de cytokines ou tempête de cytokines », responsable de l'inflammation.

Ce phénomène est observé dans de nombreuses maladies auto-immunes telles que l'arthrite juvénile idiopathique regroupant cinq maladies inflammatoires qui touche les enfants âgés de quelques mois à 15 ans, environ 5000 enfants seraient atteints d'arthrite juvénile idiopathique en France en 2015. Les causes de l'arthrite juvénile idiopathique ne sont pas encore connues, mais des anomalies du système régulant l'inflammation ont été trouvées notamment dans l'une des cinq maladies inflammatoires, la maladie de Still. Le phénomène d'orage de cytokines est aussi observé comme un symptôme aggravant dans certaines infections aux parasites, virus et bactéries tels que *Pseudomonas*, Influenza virus H5N1 et plus récemment suite à une infection au Coronavirus COVID-19. La complexité des mécanismes de la réaction inflammatoire empêche la description d'un schéma d'ensemble et oriente plutôt vers une analyse 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 l'efficacité et vérifier l'innocuité de nouveaux médicaments anti-inflammatoires. Ces candidats médicaments ont été testés en amont lors d'études de toxicité et n'induisent pas de toxicité aiguë chez l'animal, aucune douleur n'est attendue suite à l'administration de molécules thérapeutiques. En effet, toutes les molécules pharmaceutiques peuvent engendrer des effets secondaires, cependant aucun effet douloureux n'est attendu suite à l'administration des molécules thérapeutiques. 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 accrue.

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. Les molécules à tester pourront être administrées en préventif (1h à 15 jours avant induction de la maladie) ou en curatif (au moment de l'induction de la maladie) par voie orale, intrapéritonéale, sous-cutanée ou intraveineuse.

L'animal utilisé est la souris C57BL/6 ou BALB/c. L'administration de l'anti-CD3ε à l'animal se fait par voie intraveineuse sans anesthésie. Ce modèle induit une réaction inflammatoire aiguë, liée au développement de la maladie. La douleur pouvant être ressentie par l'animal suite au développement de la maladie causée par l'administration d'anti-CD3ε peut être traduite par un poil légèrement hérissé et/ou une prostration légère. Les signes sont visibles 30 minutes après administration d'anti-CD3ε.

Une surveillance quotidienne des animaux, y compris les week-ends, est effectuée pendant la période d'acclimatation. Les animaux sont observés et suivis durant la période d'expérimentation grâce à l'utilisation d'une grille de score (critères : aspect, comportement et amaigrissement). Les souris sont hébergées par 5 maximum dans des compartiments de 530 cm² à fond plein sur portoir ventilé (selon les normes d'hébergement détaillées dans 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. Des points limites adaptés sont mis en place et appliqués afin de limiter la souffrance de l'animal.

-Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois les mêmes expérimentations.

17437 Le microbiote intestinal contribue à l'absorption des nutriments, à la maturation du système immunitaire intestinal et joue un rôle clé dans la protection de l'hôte contre les infections. Il a été démontré que le microbiote intestinal ainsi que les fonctions métaboliques de l'hôte étaient significativement modifiées lors d'infection.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est une bactérie Gram positive qui est portée asymptomatiquement par près de cinquante pour cent de la population. C'est aussi une cause majeure d'infections nosocomiales, ce qui en fait un problème mondial en médecine clinique. Les infections à staphylocoques sont souvent chroniques et résistantes aux traitements antibiotiques. A notre connaissance, l'impact de *S. aureus* sur le microbiote intestinal et les fonctions métaboliques de l'hôte n'est pas du tout étudié. Or, nous avons montré dans un modèle *in vitro* que l'interaction *S. aureus* – cellule hôte peut avoir des répercussions sur le cycle cellulaire. Ces effets sont médiés par des facteurs sécrétés par *S. aureus* qui peuvent varier d'une souche à l'autre. De même, l'interaction *S. aureus*-cellule hôte modifie l'expression de nombreuses voies métaboliques dans la cellule. Nous émettons donc l'hypothèse que, comme cela a été démontré pour d'autres bactéries pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus* est capable de reprogrammer le métabolisme de l'hôte et d'altérer son microbiote intestinal, et que ces effets sont dépendants de la souche.

Les objectifs du projet proposé sont d'étudier les altérations du métabolisme de l'hôte et d'éventuelles modifications de son microbiote intestinal chez des animaux exposés aux facteurs sécrétés par *S. aureus*, en utilisant le porc comme modèle de l'homme.

Pour tester notre hypothèse, les facteurs sécrétés par 2 souches de *S. aureus* qui proviennent d'infections aiguë ou chronique chez l'homme, seront injectés par voie intraveineuse, à intervalles réguliers, à des porcs. L'analyse des métabolites et neurotransmetteurs présents dans les échantillons sanguins de l'hôte, et l'identification des communautés microbiennes intestinales dans les échantillons fécaux collectés, objectiveront la reprogrammation du métabolisme et la modification du microbiote intestinal chez des porcs exposés à des facteurs mimant l'infection à *S. aureus*. Ainsi, cette étude permettra de comprendre l'installation de l'infection chronique chez l'hôte (par extension, chez l'homme) lors de l'infection à *S. aureus*, d'améliorer le diagnostic et d'identifier de nouveaux leviers thérapeutiques.

Ce projet comprend deux étapes principales :

- La première étape consistera à définir la dose de facteurs sécrétés nécessaire pour induire un modèle d'inflammation. Les animaux seront traités avec différentes doses issues de deux souches de *S. aureus*. L'effectif prévu est de 16 porcs.
- La seconde étape consistera à évaluer l'effet du traitement sur le métabolisme de l'hôte et sur son microbiote, sur un effectif total de 30 porcs.

Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle éthique des 3R : (1) Remplacer : le projet s'intéressant à des réponses biologiques, l'utilisation d'un modèle animal vivant est indispensable. Le modèle animal choisi est le porc pour sa proximité d'un point de vue physiologique et de son microbiote intestinal avec l'homme ; (2) Réduire : les effectifs (nombre total = 46) ont été fixés à minima pour valider les modalités du modèle d'inflammation et 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 l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

17438 L'endométriose est un trouble oestrogène-dépendant fréquent chez les femmes en âge de procréer (10%). Cette pathologie se caractérise principalement par la présence de tissu endométrial à l'extérieur de l'utérus. Bien que la pathogenèse de l'endométriose ne soit pas complètement décrite, on sait que le système immunitaire joue un rôle central dans son étiologie, sa pathophysiologie et les morbidités associées de douleur, d'infertilité. Il est maintenant admis que l'endométriose est une maladie inflammatoire chronique et au vu de la bibliographie et de nos expériences *in vitro* nous avons émis l'hypothèse que l'endométriose est une pathologie de la réponse immunitaire et plus précisément du déroulement de la réponse immunitaire.

Nous avons identifié plusieurs cibles moléculaires qui pourraient permettre de moduler la réponse immunitaire et ainsi induire la disparition des lésions d'endométriase.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'impact de ces traitements sur l'initiation et le développement des lésions d'endométriase. Pour cela, nous utiliserons un modèle expérimental de référence déjà décrit dans la littérature.

Pour répondre à l'objectif du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 720 animaux sur 5 ans, en raison de 10 à 20 animaux par lot, minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. 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 expériences *in vitro* dans des modèles cellulaires. Nous ne pouvons pas remplacer ce protocole *in vivo* par des expériences *in vitro* car les études *in vitro* ne reproduisent pas l'ensemble des interactions et les réponses biologiques d'un organisme entier, et par conséquent ne permettraient pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2-Réduction : Le modèle utilisé dans ce protocole, nous permettra d'obtenir le maximum d'information à partir de chaque animal utilisé. Nous combinerons le suivi clinique, l'analyse des populations cellulaires présentes dans les lésions et l'analyse fonctionnelle *ex vivo* des cellules, sur un même animal.

Nous avons réduit au maximum le nombre de souris par lot pour obtenir des résultats statistiquement valables avec le moins d'animaux possible. Toutes les expériences seront réalisées en deux fois ce qui permettra le cas échéant de diminuer le nombre d'animaux en fonction des résultats obtenus.

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 dans les cages boules de coton, papiers absorbants, tubes en carton). De plus, les animaux seront suivis quotidiennement. 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.

17439 L'insuffisance cardiaque est une des principales causes de décès dans le monde et nécessite le développement de thérapies ainsi qu'une bonne compréhension des mécanismes impliqués dans ce processus. Les études sur la régénération du cœur chez plusieurs modèles (mammifères, poissons téléostéens, amphibiens) suggèrent que l'ensemble des vertébrés possède cette capacité mais que celle-ci disparaît au cours du développement post-embryonnaire chez certaines espèces. Les raisons de cette perte restent mal connues.

Notre hypothèse, soutenue par nos récents travaux chez l'amphibien *Xenopus laevis* et nos résultats préliminaires obtenus chez le poisson zèbre, est que les hormones thyroïdiennes (HTs) jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la capacité du tissu cardiaque à régénérer.

Ces résultats reposent sur des études pharmacologiques et montrent que l'excès ou la privation en HTs altèrent le processus de régénération du cœur chez le xénope et chez le poisson zèbre.

Afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu pendant la régénération cardiaque lorsque la signalisation thyroïdienne est perturbée, ce projet vise à étudier les effets de l'inactivation génétique de la désiodase de type II (*dio2*) en utilisant une lignée de poisson zèbre mutante pour le gène *dio2* (impliqué dans l'activation de la pro-hormone T4 en hormone thyroïdienne T3 qui est la forme transcriptionnellement active des HTs). Ainsi, l'inactivation de cette enzyme chez le mutant *dio2* entraîne une hypothyroïdie des animaux.

Ce mutant devrait permettre d'affiner les résultats sur l'implication des HTs dans le processus de régénération cardiaque chez les vertébrés. Les résultats obtenus seront mis en perspective avec nos analyses pharmacologiques, en particulier ceux obtenus avec l'IOP, un inhibiteur non spécifique de l'ensemble des désiodases. De plus, ce projet permettra d'étudier la morphologie et la physiologie du cœur chez la lignée *dio2*, afin d'analyser l'impact de cette mutation et de l'hypothyroïdie résultante sur le cœur, ce qui n'a jamais été regardé auparavant chez cette lignée mutante.

La procédure de résection cardiaque, qui est réalisée sous anesthésie avec du MS222 (méthode d'anesthésie standard communément utilisée par balnéation chez toutes les espèces aquatiques pour

pratiquer une chirurgie), est basée sur une méthodologie déjà décrite dans de nombreux travaux étudiant la régénération du cœur chez le poisson zèbre adulte. Schématiquement, il s'agit d'opérer les poissons en procédant à une ablation mécanique d'une partie du ventricule au niveau de l'apex (environ 10 à 15%), puis de récupérer les cœurs des poissons après euthanasie, aux différents temps d'analyse. Différents types de techniques immuno-histologique et moléculaire seront utilisées pour analyser le processus de régénération cardiaque. Nos analyses profiteront des résultats obtenus parallèlement avec l'analyse pharmacologique déjà en cours.

Avantages du modèle poisson :

Le poisson zèbre, ou zebrafish, est un excellent modèle d'élevage, dont le développement est bien documenté dans la littérature.

La possibilité d'étudier dans un contexte intégré la régénération d'un organe comme le cœur chez le poisson zèbre, ainsi que son altération suite à des modulations de la disponibilité en HTs, est une opportunité unique qui ne peut être atteinte dans des études *in vitro*.

La résection cardiaque chez le poisson zèbre, réalisée sous une anesthésie avec du MS222, est une procédure délicate mais bien décrite et bien maîtrisée chez ce modèle pour étudier la régénération du cœur. L'emploi d'une procédure similaire à celle pratiquée par d'autres laboratoires travaillant sur la régénération cardiaque chez le poisson zèbre permettra de pouvoir comparer nos résultats avec les données disponibles et publiées sur ce processus chez ce modèle.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R :

- Remplacement : L'étude dynamique des régulations induites suite à une résection du cœur est essentielle pour comprendre le processus de régénération cardiaque, ou son absence, en fonction de l'état physiologique de l'animal. La régénération d'un organe comme le cœur ne peut être reproduite totalement *in vitro* et nécessite de recourir à des organismes modèles animaux.

- Réduction : Compte tenu de la variabilité biologique intrinsèque aux expériences *in vivo*, 15 animaux pour l'analyse transcriptionnelle (par RT-qPCR) et 10 pour l'analyse immuno/histologique sont utilisés par condition. Les 2 conditions sont les poissons mutants *dio2^{-/-}* (condition testée), comparés aux poissons *dio2^{+/+}* (condition contrôle) à différents temps post-opératoire.

Pour l'analyse transcriptionnelle, les poissons sont récupérés à 3 temps : juste avant l'amputation (T=0), puis 3 et 7 jours après l'amputation, dans le but d'obtenir une cinétique d'expression pour les gènes étudiés pendant la phase précoce du processus de régénération, qui est une phase critique pendant la régénération.

Pour l'analyse immuno/histologique, les poissons sont récupérés à 6 temps : 3, 7, 14, 30, 50 et 90 jours après l'amputation, dans le but d'évaluer la capacité régénérative au cours du temps pour chaque condition testée. Les temps longs (30, 50 et 90 dpa) permettront de conclure s'il y a ou non une régénération du cœur et si la régénération est perturbée chez les poissons mutants. Pour les temps plus courts (3, 7 et 14 dpa), nous regarderons l'état prolifératif du cœur, une étape clé du processus de régénération (pas de prolifération > pas de nouveaux cardiomyocytes > pas de reconstruction du cœur). Enfin, nous suivrons aux différents temps, les profils de protéines clés de la matrice extracellulaire, qui sont essentielles dans la régénération du cœur.

Au total, 210 poissons adultes issus de la lignée mutante *dio2* seront utilisés dans ce projet : Pour l'analyse transcriptionnelle, 3 temps x 2 conditions x 15 poissons = 90 animaux ; Pour l'analyse immuno/histologique, 6 temps x 2 conditions x 10 poissons = 120 animaux).

- Raffinement : Les poissons sont maintenus à une densité de ~3 adultes/L pour éviter tout stress dû à une surpopulation ou un isolement. Les animaux sont nourris quotidiennement avec de la nourriture sèche pour assurer une croissance optimale ainsi que de la nourriture vivante (larves d'artémia) pour permettre un enrichissement du milieu. Les paramètres de l'eau (température/salinité/nitrate/nitrite/pH) sont surveillés régulièrement. Les opérations cardiaques sont réalisées sous anesthésie avec du MS222, puis les animaux font l'objet d'un suivi quotidien et tout animal présentant un comportement anormal est euthanasié.

17440 Les glioblastomes (GB) sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. L'évolution de cette pathologie est rapide et fatale. La prise en charge thérapeutique conventionnelle associe la résection chirurgicale, la radiothérapie (RT) et la chimiothérapie (CT). La médiane de survie des patients, malgré les avancées scientifiques, est inférieure à 15 mois. Améliorer la survie des patients passe par une meilleure compréhension de la pathologie et de ses mécanismes.

A l'occasion de la chirurgie d'exérèse du GB, les patients sont soumis à une anesthésie générale intraveineuse dont on ignore à ce jour l'impact sur le devenir des patients. Il semblerait que le propofol, hypnotique le plus largement utilisé dans le monde au cours d'une anesthésie générale, ait potentiellement un rôle antitumoral dans le cadre du GB (Xu et al., *Oncology Letters* 2018)

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'influence du propofol, sur la croissance tumorale dans des modèles de GB murins et sur les traitements, notamment la RT.

Dans le cadre de ce projet, l'étude portera sur 3 modèles cellulaires de GB (GL251, U251-MG, cellules issues de biopsies de patients) afin de conforter les résultats obtenus. Du fait de l'origine des lignées cellulaires étudiées (humaines ou murines), des animaux immunocompétents (souris C57BL/6) et immunodéprimés (souris Swiss Nude) seront utilisés comme modèle animal de GB :

- Cellules GL261 (lignée cellulaire de GB murin) : implantées chez des souris C57BL/6
- Cellules de U 251-MG (lignée cellulaire de GB humain) : implantées chez des souris Swiss Nude
- Cellules de GB dérivées de biopsies de patients (PDX) : implantées chez des souris Swiss Nude

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer). Raffiner : les animaux seront hébergés en groupe dans des cages standards aux normes européennes. Les animaux auront accès à la nourriture et à la boisson de manière illimitée. Les points limites fixés pour cette étude sont une perte pondérale de 15 % par rapport au poids de l'animal lors de l'implantation, ou une taille de tumeur de 80 mm³. Le comportement général des animaux sera également évalué (posture, toilette) avec un suivi biquotidien par du personnel formé 5j/7 et quotidien pendant les WE et jours fériés. Toutes les interventions susceptibles d'induire de la douleur chez les animaux seront réalisées sous anesthésie associée à l'administration d'analgésiques.

Réduire : Afin d'assurer une puissance statistique suffisante, nous estimons qu'il sera nécessaire d'utiliser 15 souris pour chaque groupe expérimental. Ce nombre d'animaux est le nombre minimal permettant d'atteindre une puissance statistique de l'ordre de 80%. Dans cette étude, 8 groupes d'animaux seront étudiés pour chaque modèle cellulaire de GB : (1) tumeur non-traitée, (2) tumeur + véhicule, (3) tumeur + propofol Dose 1, (4) tumeur + propofol Dose 2, (5) tumeur + radiothérapie, (6) tumeur + radiothérapie + véhicule, (7) tumeur + radiothérapie + propofol Dose 1 et (8) tumeur + radiothérapie + propofol Dose 2. Ainsi, 120 souris seront utilisées pour chaque modèle cellulaire. En résumé, le nombre total d'animaux estimé pour cette étude est de 360 souris (15 souris/groupe x 8 groupes x 3 modèles cellulaires de GB).

Remplacer: la souris représente un modèle de choix afin d'étudier la croissance tumorale lors du suivi longitudinal par IRM.

17441 Nous étudions le développement du système nerveux central d'un mammifère, la souris. Pour cela, nous utilisons des approches de marquage transgénique de type « Brainbow » permettant d'exprimer des combinaisons de protéines fluorescentes de différentes couleurs dans les cellules souche neurales (CSN) et leur descendance (neurones, cellules gliales). Les clones de cellules issus de la division d'une même cellule progénitrice sont ainsi identifiées par des couleurs distinctes. Nous utiliserons cette stratégie d'analyse du lignage cellulaire pour suivre le devenir des CSN *in vivo* et déterminer leur contribution individuelle à la construction de différentes régions du cerveau : cortex cérébral, hippocampe et cervelet. Nous étudierons *in vivo* le comportement, les interactions et le lignage des progéniteurs neurales et caractériserons la composition, l'organisation et la connectivité des clones de neurones qu'ils génèrent en contexte normal ou expérimentalement perturbé. Ce projet fera appel des animaux dont le marquage multicolore sera déclenché soit par croisement de lignées transgéniques Brainbow avec des lignées exprimant une recombinase site-spécifique Cre (active de manière constitutive ou induite par administration du ligand synthétique Tamoxifène, n'impliquant pas de chirurgie), soit par électroporation *in utero* (chirurgie de type laparotomie, de classe modérée, sans

effets nocifs pour la survie des embryons ou des souris gestantes). Nous utiliserons en fonction de la question biologique posée des lignées de souris transgéniques Brainbow et/ou exprimant la recombinaison Cre, ou des souris contrôles. Les analyses histologiques des cerveaux seront réalisées post-mortem par microscopie optique sur coupes histologiques.

Pour l'ensemble du projet, un nombre global de 1448 embryons et 2874 souriceaux ainsi que 499 femelles gestantes (total 4821) est prévu. L'utilisation de l'animal est indispensable dans ce projet du fait de la complexité de l'organisation du cerveau des mammifères. Des études préliminaires sur nos systèmes de marquages ont été réalisées préalablement *in vitro*. Conformément à la « règle des 3R », nous avons limité le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et scientifiquement fiables. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie et seront hébergées dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale. Pour la procédure d'électroporation, la douleur sera prévenue par administration d'analgésique en post-opératoire. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée, permettant une surveillance adaptée aux procédures afin de s'assurer de leur bien-être.

17442 Notre groupe étudie la dynamique des réseaux de neurones sous-jacents au codage sensoriel, à la formation de la mémoire et à la représentation de l'espace. Nous abordons ces questions en utilisant des méthodes optiques avancées dont nous améliorons continuellement la sensibilité, la résolution temporelle, la profondeur de pénétration ou l'adaptabilité aux animaux non contraints.

Nous étudions ainsi comment les informations sensorielles sont représentées dans le cortex à l'échelle des réseaux de neurones. Nous nous intéressons aux informations tactiles collectées par les vibrisses de rongeurs, auditives et visuelles. Nous cherchons à comprendre comment la représentation de ces signaux est modulée par différents processus, comme l'attention, l'anticipation ou le contexte et par l'apprentissage d'association entre stimulus et récompenses. Enfin nous étudions la dynamique des réseaux hippocampiques lors de l'exploration spatiale et de la formation d'une mémoire de l'espace.

Pour étudier ces questions, il est nécessaire d'enregistrer l'activité de larges populations neuronales dans des animaux éveillés, soit tête-fixée soit libre de se mouvoir. Les techniques optiques permettent d'obtenir des informations non seulement sur l'activité neuronale mais aussi sur la nature génétique ou anatomique des cellules enregistrées. Nous avons donc choisi de les utiliser dans nos études, en plus d'approches électro-physiologiques et nous participons également à leur amélioration. L'enregistrement optique de l'activité neuronale au sein de grands réseaux corticaux avec une résolution cellulaire reste en effet un défi technique majeur. Les principales limites sont la profondeur de pénétration, la résolution temporelle et la sensibilité des enregistrements optiques. Pour repousser ces limites, nous développons des stratégies de balayage au moyen de déflecteurs acousto-optiques (AOD) pour la microscopie à fluorescence à deux photons. Notre groupe a également développé une nouvelle génération de fibroscope permettant d'enregistrer et de moduler l'activité des neurones avec une résolution cellulaire et à une cadence rapide chez la souris non contrainte.

Bien que modérément invasives, ces approches ne peuvent cependant pas être appliquées sur l'homme directement, et nous devons utiliser des modèles animaux. Nous avons choisi dans notre équipe le modèle des rongeurs pour plusieurs raisons. Il permet tout d'abord de réaliser des expérimentations sur animal vivant et éveillé, impératif pour étudier les aspects moteurs, attentionnels, et mnésiques. Il présente également un exemple d'interaction sensori-motrice grâce au système des vibrisses, longues moustaches utilisées par ces animaux pour explorer activement leur environnement tactile. Enfin, les rongeurs nous permettent de bénéficier des nombreux développements récents dans le domaine de l'opto-génétique pour déterminer le rôle spécifique de certaines catégories de cellules dans l'orchestration de l'activité des différentes structures du cortex et de l'hippocampe.

Dans ce projet, nous nous efforçons de respecter au mieux la « règle des 3R ».

- Remplacer. Nos projets sont menés dans la plupart des cas en collaboration avec des équipes de théoriciens, ce qui permet d'utiliser les données expérimentales pour modéliser certains phénomènes

de codage et d'apprentissage. Ce couplage entre expérience et théorie permet ainsi d'effectuer certaines étapes de nos études sous forme de modèles théoriques qui guident nos explorations et nous permettent de remplacer des études exhaustives de tous les cas de figures expérimentaux. Cette stratégie nous permet donc de remplacer l'emploi expérimental d'animaux dans certaines des questions que nous abordons.

- Réduire. Nos projets allient des développements technologiques en optique, avec leur application pour l'exploration des traitements des informations par le cortex et l'hippocampe. L'emploi des animaux dans nos expériences suit deux logiques différentes. La mise au point de nouvelles microscopies implique dans la phase finale de développement l'utilisation d'animaux pour démontrer leur principe et leur potentiel. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum permettant de converger vers une solution microscopique convenable. L'exploration des fonctions du cortex et de l'hippocampe fait appel à des animaux engagés dans des protocoles bien établis et maîtrisés par les membres de l'équipe. Dans ce cas, le nombre d'animaux utilisé est choisi comme le minimum permettant d'établir la significativité statistique des mécanismes étudiés.

- Raffiner. Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies. Les chirurgies nécessaires sont effectuées en administrant les analgésiques et anesthésiants nécessaires pour éviter toute souffrance de l'animal. Dans toutes les expériences de comportement, une phase d'habituation à l'expérimentateur est systématiquement insérée pour minimiser le stress de l'animal. Dans tous les cas, un suivi précis du stress ou de l'inconfort ressenti par les animaux est effectué afin de les supprimer au maximum. Des tests systématiques et des critères objectifs sont mis en place pour évaluer l'état des animaux et détecter toute souffrance. Seules des personnes entraînées réalisent les manipulations d'animaux afin de suivre les règles de bonnes pratiques.

Ce projet utilisera 2240 souris et 290 rats.

17443 L'Anévrisme de l'Aorte Abdominale (A.A.A.) est une dilatation qui touche la portion abdominale de l'aorte. On parle d'anévrisme de l'aorte lorsque celle-ci n'a plus de bords parallèles et se dilate. Après 60 ans, la fréquence de la maladie dans la population (prévalence) est de 4 à 8 % chez l'homme et 1 à 3 % chez la femme. Cette prévalence est trois fois plus importante en cas de facteurs de risques cardiovasculaires (tabac, hypertension artérielle...) ou d'antécédents familiaux. Le nombre de nouveaux cas par an est de 39 cas pour 100 000 habitants. Le risque évolutif est la rupture de l'anévrisme. Ce risque devient important lorsque le diamètre est supérieur à 50 mm. La rupture se fait le plus souvent dans la cavité abdominale, responsable d'une hémorragie massive, souvent mortelle. L'A.A.A. est souvent découvert par hasard au cours d'un examen radiologique fait pour une autre pathologie. Le traitement d'un A.A.A. nécessite alors une prise en charge dans un service de chirurgie vasculaire.

L'étude de traitements pharmacologiques afin de réduire les risques de rupture représente donc un enjeu majeur pour le traitement de la maladie.

Récemment, il a été mis en évidence une prolifération de vaisseaux lymphatiques dans la paroi de l'artère anévrysmale. Cependant, le rôle de ces vaisseaux est encore inconnu et fera l'objet de notre étude. Le système lymphatique joue un rôle primordial dans les maladies inflammatoires chroniques et a pour rôle de faciliter l'afflux de cellules immunes aggravant ainsi la maladie. Nous postulons que ces vaisseaux pourraient participer à l'aggravation de l'anévrysme et pourraient ainsi constituer une cible thérapeutique majeure pour cette pathologie.

L'équipe s'intéresse aux régulations des facteurs lymphangiogéniques dans les pathologies vasculaires. Elle a récemment mis en place des outils en thérapie génique favorisant la normalisation de la vasculature. Nous nous proposons d'utiliser les outils mis en place afin de débiter un projet visant à caractériser le rôle du système lymphatique dans l'évolution des AAA. Dans cette étude, nous proposons de reproduire l'AAA dans un modèle animal chez la souris. Cette étude nécessitera l'expérimentation sur 210 animaux. En effet, l'anévrysme étant une maladie faisant intervenir le système circulatoire lymphatique et sanguin, le système immunitaire, ainsi que l'ensemble des composants cellulaires de la paroi artérielle, il est nécessaire d'étudier cette maladie dans un organisme vivant mettant en jeu ces différentes populations. Nous travaillons dans le respect des 3R "Remplacer,

Réduire, Raffiner". 1/ Nous remplaçons dès que possible l'expérimentation animale par des tests en culture de cellules afin de limiter les molécules testées *in vivo*, 2/ nous réduisons le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour avoir un test statistique permettant de tirer une conclusion et nous utilisons un groupe contrôle commun pour tous les groupes traités, 3/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. Les animaux sont examinés cliniquement quotidiennement ou plus fréquemment en fonction de leur état. 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. Pour éviter la douleur nous utilisons des anesthésiques et des antalgiques dès que c'est nécessaire.

17444 L'infertilité, définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme l'incapacité d'un couple à parvenir à une conception et à mener une grossesse à terme après un an ou plus de rapports sexuels réguliers, constitue un problème de santé publique majeur qui concerne près de 15% des couples. Les causes d'infertilité sont multiples et des facteurs d'origine masculine sont impliqués dans près de la moitié des cas avec le plus souvent une anomalie des paramètres du spermogramme indiquant une diminution quantitative et/ou qualitative du sperme.

Le but principal de notre projet est d'identifier certaines causes génétiques d'infertilités masculines afin d'améliorer la prise en charge des patients et à plus long terme de développer des procédés thérapeutiques adaptés pouvant contourner l'utilisation des techniques d'assistance à la procréation médicale. Nous nous intéressons plus particulièrement aux gènes essentiels à la production des spermatozoïdes ainsi qu'à leur maturation fonctionnelle post-testiculaire leur permettant d'acquérir la mobilité et le potentiel de fécondation. Grâce à des études génétiques de cohortes de patients infertiles, nos travaux ont déjà permis d'isoler plusieurs gènes dont les mutations sont responsables d'infertilité masculine. Notre objectif est d'étudier certains de ces gènes dans le modèle de souris (dont la majorité des gènes impliqués dans la fertilité sont identiques aux gènes humains), afin de comprendre leur mécanisme de fonctionnement et d'élaborer des pistes thérapeutiques.

Pour cela, notre projet comprend l'utilisation de modèles de souris transgéniques (gène invalidé ou portant une étiquette rapportrice). Une seule procédure sera réalisée dans le cadre de ce projet, procédure de stimulation hormonale qui nécessitera l'utilisation de 750 souris femelles au maximum, pour l'étude de la fertilité mâle de 10 modèles transgéniques.

La fertilité des souris mâles transgéniques sera testée « *in vivo* » par mise en accouplement avec des femelles sauvages et « *in vitro* » par mise en présence des spermatozoïdes issus de ces mâles transgéniques avec les ovocytes de femelles sauvages préalablement super ovulées (procédure de stimulation hormonale par injection intrapéritonéale). Chez la souris comme dans l'espèce humaine, les femelles ne produisent à chaque cycle que quelques ovules. L'injection d'hormones au cours de cette procédure permettra une super ovulation assurant la maturation de 3 à 4 fois plus d'ovocytes qu'en cycle spontané. De nombreuses femelles sauvages seront néanmoins nécessaires pour obtenir des ovocytes en grand nombre et réaliser les analyses *in vitro*.

Le projet sera réalisé dans le respect du principe des 3R :

- Réduire : Le nombre de souris femelles sera réduit au minimum. La procédure de stimulation hormonale permettra de récolter plus d'ovocytes. Par ailleurs, dans les cas où le test de fertilité "*in vivo*" effectué en première intention, indiquera une infertilité sévère des mâles transgéniques testés, nous ne procéderons pas à des tests de fécondation "*in vitro*" nécessitant la stimulation hormonale de souris femelles supplémentaires. Le test de fécondation "*in vitro*" incluant la procédure de stimulation hormonale sera donc réservé à des situations d'hypofertilité ou réalisé pour confirmer l'absence de phénotype d'infertilité des souris transgéniques testés.

- Raffiner: Au sein de l'animalerie, zootechniciens et personnels d'équipe de recherche veilleront quotidiennement au bien être des animaux et contrôleront leur état de santé. Les animaux disposeront de cotons et d'abris adaptés, pour enrichir leur environnement.

- Remplacer: Il n'est pas possible de contourner le recours au modèle animal car là l'heure actuelle, il n'existe aucune technique permettant la production de spermatozoïdes ou d'ovocytes *in vitro*. Cependant, à chaque fois que cela sera possible, des modèles cellulaires *in vitro* seront développés

afin de réduire le nombre d'animaux utilisés; notamment pour les études en biologie moléculaire et cellulaire permettant de confirmer le rôle des gènes d'intérêt pour la production et maturation des spermatozoïdes.

17445 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC), caractérisée par une inflammation, démyélinisation et dégénérescence axonale. Des études expérimentales ont montré que la perte de myéline, se traduit par la perte axonale et le handicap final. La thérapie cellulaire est une approche pour promouvoir la remyélinisation. Donc, trouver une source extensible, fiable et autologue de cellules à potentiel myélinique en vue d'améliorer la remyélinisation du SNC est nécessaire. Des cellules progénitrices neurales dérivées de cellules fetales cérébrales (fNPC) et cellules pluripotentes induites (iPSC-NPCs) ont été développées très récemment. Le potentiel de remyélinisation et la sécurité de ces cellules modifiées doivent être étudiées de manière approfondie. Le potentiel thérapeutique de ces cellules sera étudié après transplantation dans la moelle épinière démyélinisée de souris. La dynamique de différenciation en oligodendrocytes et potentiel de réparation de la myéline en présence ou non d'une molécule potentiellement pro-myélinisante sur la réparation seront testés en post-mortem par immunohistochimie, microscopie électronique, et dans certains cas RT-PCR et électrophysiologie. L'ensemble de l'étude portera sur 4868 souris. 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 myélinisation et la réparation de lésions de la myéline et les approches thérapeutiques basées sur la thérapie cellulaire. 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; Afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, aucune greffe ne sera réalisée sur les souris wild type. Si nécessaire, les souris hétérozygotes, qui présentent des phénotypes similaires aux souris wild type, serviront de contrôle. Dans la même volonté de diminuer au maximum le nombre de portées pour réaliser les expériences, les 2 sexes seront utilisés indistinctement. 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; la douleur sera prise en compte via un traitement analgésique et le suivi des animaux sera réalisé de manière régulière afin de limiter leur angoisse et détecter tous les comportements anormaux. Les animaux seront hébergés en groupe et dans un environnement enrichi.

Cette étude devrait contribuer au développement de futures stratégies thérapeutiques applicables à des modèles primates non-humain puis à l'homme et éviter ainsi l'installation de troubles définitifs.

17446 La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie utilisée couramment par les services de médecine nucléaire. Après l'administration intraveineuse d'une molécule radio-marquée (radiopharmaceutique ou radiotraceur), cette technique aide au diagnostic et à l'évaluation de stratégies thérapeutiques, principalement en oncologie, neurologie et cardiologie. Cependant, le nombre de radiotraceur disponible reste faible et seul le [18F]-FDG est utilisé régulièrement en milieu hospitalier. Notre équipe, à l'interface de la chimie-radiochimie et de la biologie, développe de nouveaux radiopharmaceutiques marqués principalement au fluor-18 (18F) et au carbone-11 (11C) 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 l'organisme, 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 radiotraceur sont donc d'abord étudiées sur des rongeurs sains : sa pharmacocinétique (cinétiques de distribution, de métabolisation et d'élimination) et sa spécificité pour la cible biologique. Dans le cas d'un radiopharmaceutique destiné au diagnostic d'une pathologie particulière, le nouveau composé sera ensuite caractérisé avec un modèle animal adéquate. Ce type d'expérimentation est le seul moyen disponible aujourd'hui pour évaluer un radiotraceur dans un cadre physiopathologique global. Ces études, basées sur l'expérimentation animale, prennent en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répondent à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner).

Par définition, un radiotracteur est formulé en solution injectable et administré à dose « traceuse », c'est à dire sans effets biologiques ou radiologiques. L'administration intraveineuse est un standard car les autres voies d'injection ont un impact majeur sur la pharmacologie des composés et ne sont pas transposables en recherche clinique. Nous réalisons donc en routine des injections directes au niveau de la veine caudale aussi bien chez le rat que la souris. Les administrations répétées, pour le suivi d'une pathologie dans le temps ou la comparaison de plusieurs radiopharmaceutiques chez un même animal, sont donc réalisables facilement et sans induire de douleurs (tout en réduisant fortement le nombre d'animaux nécessaires). Nous travaillons actuellement sur un modèle animal chez la souris C57Bl6 et prévoyons de suivre l'évolution de la pathologie sur plusieurs semaines et avec plusieurs radiopharmaceutiques différents. Cependant, nous sommes confrontés à des difficultés d'administration et nous souhaiterions pouvoir recourir à titre exceptionnel à des injections intraveineuses par le sinus retro-orbital (RO). En effet, les souris C57Bl6 ont une peau sombre, une petite taille et une arborisation veineuse complexe par rapport aux souris blanches que nous utilisons habituellement. Les injections intraveineuses sont donc plus longues à réaliser et ces difficultés peuvent s'accroître avec l'avancement du projet (cicatrices), ce qui augmente la durée d'exposition des agents à la radioactivité. Nous avons aussi observé qu'une fraction de la radioactivité reste présente dans les tissus par extravasation (jusqu'à 30%) bien que le geste technique soit réussi. L'analyse des données s'en trouve biaisée et nous risquons de devoir refaire certaines acquisitions (et d'augmenter le nombre d'animaux total). Nous pourrions recourir à la pose d'un cathéter avec chirurgie, cependant cela impliquerait ici de faire plusieurs interventions consécutives sur un même animal (et de recourir à des antidouleurs, ce qui est incompatible avec nos études) ou de multiplier le nombre d'animaux utilisés.

Nous souhaiterions donc réaliser des injections dans le sinus RO. Ce geste technique est simple et rapide à réaliser pour l'expérimentateur et plusieurs publications dans la littérature scientifique ont montré son efficacité et son innocuité pour l'imagerie TEP. Pour chaque animal, nous nous limiterons à 2 injections de 100µL maximum par sinus, en alternant les côtés (selon les recommandations vétérinaires). La première partie du projet permettra de tester chez la souris saine (10 max) la pertinence de la méthode dans nos conditions expérimentales : injection RO d'un radiopharmaceutique connu puis suivi sous la caméra TEP pendant une heure de façon à contrôler la bonne distribution du composé et l'absence de rétention de la radioactivité au point d'injection. En cas de réussite, nous inclurons ce protocole expérimental dans notre projet disposant déjà des autorisations nécessaires. Ce dernier se compose d'une étude pilote (3x 3 animaux) puis d'une étude approfondie (3x 5 animaux). Enfin, une procédure sans réveil est incluse pour permettre l'entraînement des agents à ce type d'injection (10 souris maximum) mais sans utilisation de radiopharmaceutiques. Nous atteignons ainsi un maximum de 44 souris pour le projet.

Pour rappel, l'absence de souffrance fait partie des critères de sélection des modèles animaux avant de débiter chaque projet, nos procédures ne prévoyant pas l'emploi d'antidouleurs pour ne pas interférer avec les processus inflammatoires tumoraux et les radiopharmaceutiques. Les animaux sont élevés et hébergés dans une animalerie conventionnelle attenante au laboratoire et respectant leurs besoins physiologiques et comportementaux. Ces animaux sont manipulés systématiquement sous anesthésie gazeuse (isoflurane) avec surveillance du rythme respiratoire et maintien de la température corporelle autour de 37,5°C. Un contrôle quotidien de l'état général des animaux porteur de tumeur sera réalisé par la personne en charge de l'entretien des animaux. Un contrôle approfondi et une pesée tous les 2 à 3 jours seront réalisés durant la durée totale du protocole, ce dernier n'excédant pas 3 semaines et tout animal présentant des signes de souffrance sera systématiquement mis à mort : perte de poids supérieure à 15% de son poids initial, affaiblissement, prostration, paralysies, trouble du comportement, états des poils. Le volume tumoral, mesuré au pied à coulisse, ne dépassera pas 10% de son poids (1cm³ représente environ 1g). Les résultats scientifiques nécessitent d'utiliser un nombre minimum d'animaux par condition expérimentale pour que les tests statistiques soient valides (minimum 10), représentatifs d'éventuelles variations interindividuelles, et permettant d'appliquer des tests paramétriques (ANOVA puis test Post Hoc) suivant le principe de réduction du nombre final d'animaux à utiliser.

17447 Notre projet s'inscrit dans la continuité de notre travail sur l'induction de la tolérance suite à l'expression d'un transgène au niveau du foie. Nous avons pu caractériser dans notre modèle de greffe allogénique une population de lymphocyte CD8 avec un profil particulier. Nous avons découvert que cette population était responsable de la mise en place de la tolérance avec des marqueurs communs aux cellules régulatrices. Une première approche par des tests in-vitro a pu montrer une fonction suppressive de ces cellules néanmoins nous souhaiterions pouvoir étudier cette fonction dans un contexte in-vivo. L'objectif de cette nouvelle étude est d'investiguer sur la capacité suppressive in-vivo de ces cellules en utilisant 2 modèles chez la souris qui ont été mis au point dans notre équipe. Le premier modèle consiste à induire un hépatocarcinome chez la souris par injection de cellules tumorales et étudier après transfert des cellules régulatrices l'activité suppressive. Ce test est réalisé sur une courte période permettant de limiter les dommages causés aux animaux (phase précoce de développement tumoral sans besoin d'aller au-delà comme les études de survie). Si les résultats du premier modèle sont encourageants nous poursuivrons avec un second modèle qui consiste en une greffe d'îlots pancréatique allogéniques chez des souris rendues diabétiques ; Comme pour le premier modèle l'activité suppressive des cellules sera étudiée après transfert des cellules. Ce modèle est un peu plus long avec un suivi régulier des animaux afin d'observer la phase de rejet et limiter également les dommages. C'est un modèle qui a déjà fait ces preuves avec un retour d'expérience permettant d'appréhender les dommages et gérer ceux-ci.

Ce projet est conforme aux règles des 3R, avec une réflexion et une approche coût/bénéfices. Avant de passer par les tests in-vivo nous avons pu étudier ces cellules in-vitro dans des modèles de co-culture, les résultats ont démontré que les mécanismes d'action de ces cellules étaient plus complexes que ce que nous pouvions observer in-vitro. La difficulté majeure est que nous ne pouvons pas mimer l'environnement hépatique, d'où la nécessité d'avoir recours à l'animale et l'impossibilité de le remplacer.

Nous utiliserons 615 souris, correspondant à :

- 240 pour le modèle hépatocarcinome.
- 375 pour le modèle de greffes

Ce nombre d'animaux correspondant à des groupes de 5 souris/conditions permettant une réduction du nombre d'animaux et malgré un effectif réduit une approche statistique pertinente. Ce nombre comprend la répétabilité des expérimentations (3 expériences) afin d'éliminer des biais potentiels, néanmoins toujours dans une optique de réduction du nombre d'animaux cette répétabilité pourrait être réduite à 2 expériences en l'absence de biais (bonne reproductibilité sur 2 lots). Pour l'injection des cellules régulatrices, nous avons planifiés d'utiliser 10 souris donneuses pour deux receveuses ; ce nombre permet d'obtenir un minimum de cellules pour analyser l'effet suppresseur. Notre expérience a pu montrer que la population régulatrice peut être variable d'une souris à l'autre, et donc dans le cas d'une plus grande proportion après tri des cellules des donneuses, toujours dans cette optique de réduction il nous serait possible à partir de ce nombre de donneuses, d'injecter une receveuse supplémentaire réduisant ainsi le nombre de donneuses nécessaires au projet. Les méthodes de raffinement tiendront compte de l'environnement de l'animal, du choix des protocoles et des méthodes appliquées afin de réduire le stress ainsi que la douleur. Les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage. Des brindilles de papier sont utilisées pour l'enrichissement. Nous mettrons en place un processus d'habituation sonore (tapotement sur la cage) avant de récupérer celle-ci afin que les animaux soient conditionnés et associent ce signal à une intervention de l'expérimentateur avec pour bénéfice une réduction du stress. Le protocole d'induction du diabète utilisé dans notre équipe est peu délétère pour l'animale, conditionnant ainsi le choix de ce protocole pour nos projets. Nos expériences antérieures sur ce protocole sont un atout nous permettant d'appréhender toutes douleurs ou détresses inutiles et la connaissance des points limites. Le diabète induit une urine très abondante qui modifie l'environnement du rongeur et donc son comportement stress, agressivité. La sciure sera changée plus souvent afin de limiter cet impact. Lors des phases de chirurgies, les animaux recevront des analgésiques adéquats et une vigilance accrue les 7 jours post chirurgie (vérification des sutures, phase de cicatrisation, pas d'infection). Nous mettrons en place un suivi régulier des animaux après l'induction de l'hépatocarcinome. Normalement la durée après l'induction

de l'hépatocarcinome limite les dommages causés aux souris, malgré tout nous surveillerons les signes cliniques et définirons des points limites.

17448 Les Entérobactéries comme *Escherichia coli* (Ec) ou *Klebsiella pneumoniae* (Kp) sont des commensaux naturels du tractus gastro-intestinal humain. Ces deux espèces bactériennes peuvent en revanche devenir pathogènes si elles sont disséminées vers d'autres organes du corps humain, et être la cause d'infections comme une infection urinaire, une pneumonie voire une septicémie. Comme la plupart des autres pathogènes bactériens d'importance en santé humaine, Ec et Kp peuvent acquérir des résistances à de multiples antibiotiques, notamment les céphalosporines de troisième génération, ainsi que les carbapénèmes. On parle alors de bactéries carbapénème-résistantes (CR) et/ou Bêta-lactamase à spectre étendue (BLSE). La présence de Ec et/ou Kp CR/BLSE+ dans l'intestin de patients subissant une intervention chirurgicale lourde, a été associée à un risque plus élevé d'infection au niveau du site opératoire, ou d'infection nosocomiale voire disséminée. Parce qu'elles sont difficiles à traiter avec les antibiotiques actuellement disponibles, ces infections augmentent la durée de séjour à l'hôpital, et affectent négativement le pronostic de ces patients.

Dans ce contexte, nous développons une nouvelle génération d'antimicrobiens (éligobiotiques) permettant de cibler une espèce ou sous-espèce bactérienne au sein d'un environnement microbiologiquement complexe comme l'intestin. De plus, cette technologie permet de concentrer les propriétés antimicrobiennes sur les seules bactéries possédant une séquence génétique particulière, comme par exemple celle conférant la résistance à un antibiotique. Les tests *in vitro* effectués au laboratoire montrent que les éligobiotiques peuvent rapidement tuer les bactéries cibles (Ec et Kp CR/BLSE), sans affecter les autres Ec et Kp qui ne portent pas ces gènes de résistance. Cependant ces tests *in vitro* ne permettent pas de récapituler la complexité du tractus digestif de l'homme. La démonstration de l'efficacité des éligobiotiques dans un modèle animal est une étape clé avant la mise en place d'une étude clinique chez l'homme.

Afin de valider ce traitement dans un contexte plus proche d'un microbiome naturel, nous souhaitons utiliser un modèle murin de colonisation par des bactéries Ec et Kp. Ces deux espèces bactériennes n'étant pas des pathogènes naturels de la souris, nous n'anticipons aucune complication particulière. Le but de ce traitement est d'être utilisé en prophylaxie, afin de décoloniser le patient des CR/BLSE Ec et/ou Kp avant l'intervention chirurgicale. Il s'agira donc ici de démontrer la capacité de notre traitement à tuer des souches Ec et Kp CR/BLSE+ directement dans l'intestin des souris, après administration orale des éligobiotiques. La spécificité du traitement sera également étudiée, en confirmant que d'autres souches d'Ec et Kp ainsi que les résidents naturels du microbiome ne sont pas affectés par le traitement. La colonisation et la persistance des espèces bactériennes d'intérêt seront suivies au cours du temps via l'analyse d'échantillons fécaux, récoltés de façon non-invasive, ce qui minimise grandement l'inconfort et la souffrance des animaux. Une alternative à la décolonisation pure sera de vérifier que plus aucune bactérie ne possède les gènes de résistances ciblés par le traitement.

Dans ce projet, nous prévoyons d'utiliser 2380 souris sur 5 ans. Ces animaux seront répartis en 4 procédures. L'ensemble de ces procédures seront de sévérités légères car les souches Ec et Kp testées dans ce protocole ne sont pas des pathogènes murins et ne provoquent aucun symptôme. Seul un léger inconfort des animaux au moment du gavage sera constaté. Dans tous les cas un suivi visuel de nos animaux sera effectué chaque jour pour détecter tout mal-être de nos animaux. De plus, dans le but de réduire le nombre d'animaux tout en gardant un nombre d'animaux suffisant pour une robustesse statistique, nous avons consulté un bio-statisticien pour être certain d'utiliser un nombre d'animaux au plus juste dans cette étude.

Les bénéfices attendus de ce traitement seront applicables à tous les patients subissant une intervention chirurgicale dans les pays occidentaux qui sont porteurs d'Ec et/ou Kp CR/BLSE+, sachant que 50 % d'entre eux développeront une infection CR/BLSE+ dans le mois suivant l'intervention chirurgicale. L'objectif est de ramener ce risque à celui des patients non-colonisés (environ 4 %).

17449 Contexte scientifique

La plupart des organismes aquatiques font face à l'impossibilité de s'extraire de leur milieu de vie lorsque celui-ci subit des changements, d'origine naturelle ou liés à l'activité humaine. Souvent

synonymes de contraintes, ces modifications de l'environnement peuvent entraîner des conséquences importantes au niveau de l'ensemble de l'écosystème aquatique. Ainsi, la capacité d'adaptation (ou plasticité) de ces organismes s'avère être une caractéristique majeure et indispensable pour leur survie. Être « plastique » permettrait alors d'être plus performant face à des contraintes environnementales changeantes. De fait, existe-t-il un gradient de plasticité entre des espèces à fort potentiel invasif d'un côté, et des espèces en voie d'extinction de l'autre ? Intuitivement, les espèces invasives présenteraient une plasticité importante alors que les espèces en voie d'extinction seraient moins capables de s'adapter.

Description des objectifs du projet et des dommages versus les bénéfices apportés

Ce projet de 5 ans s'insère dans ce contexte de conservation des écosystèmes aquatiques et a pour buts principaux :

- 1) d'apporter des connaissances fondamentales en physiologie et en comportement chez des espèces d'intérêt, qui à ce jour n'ont pas encore été étudiées de cette façon.
- 2) d'expliquer la différence de répartition majeure entre des espèces de poissons considérés comme invasifs et à l'opposé, des poissons en voie d'extinction,
- 3) et enfin de comprendre les processus physiologiques et comportementaux qui façonnent la dispersion et plus globalement l'écologie des organismes aquatiques.

Afin de tester cette hypothèse, 3 espèces de poissons d'eau douce benthiques, présentant les mêmes niches écologiques seront comparés :

- Le Gobie à tâche noire (*Neogobius melanostomus*) : espèce non native qui est considérée comme très invasive. L'expansion de la zone de présence de ce poisson est largement surveillée par les organismes de conservations. Connaître l'écophysiologie de cette espèce permettra de mieux appréhender les mécanismes adaptatifs d'une espèce invasive et de mieux comprendre les interactions avec les autres espèces.

- L'Apron du Rhône (*Zingel asper*) : espèce en danger critique d'extinction (liste rouge IUCN), ce poisson endémique hautement emblématique fait l'objet d'un Plan National d'Action pour sa sauvegarde. Depuis plusieurs années, de nombreux projets de recherche ont permis de récolter une grande quantité de données sur cette espèce en danger, mais justement lié à ce statut, très peu se sont concentrés sur une approche physiologique. Grâce à l'utilisation d'aprons issus d'élevage, un des atouts du projet sera la possibilité de caractériser la physiologie de cette espèce.

- Une espèce commune des eaux douces françaises, le chabot commun (*Cottus gobio*), qui n'est ni invasive ni en voie d'extinction et qui constituera le « témoin » de comparaison par rapport aux deux extrêmes.

Ces trois espèces constituent un panel intéressant pour confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une plasticité différente selon la capacité de disperser.

Afin de tester ces capacités d'adaptation, des groupes de poissons seront exposés de façon chronique (~30 jours) à 4 conditions expérimentales mimant des contraintes environnementales (température, teneur en oxygène, pH et pollution sonore). Afin de pouvoir extrapoler les résultats obtenus dans un contexte écologique, ces variations du milieu vont être réalisées soit de façon constante, soit de façon intermittente, dans des gammes potentiellement rencontrées en milieu naturel. Ces différentes conditions vont entraîner une adaptation physiologique et/ou comportementale des individus de chaque espèce.

Une fois acclimaté, chaque individu (n= 240 individus par espèce, soit un total de 720 poissons sur 5 ans, ou 48 poissons de chaque espèce/an) sera inclus dans le protocole expérimental décrit ci-après visant à caractériser ces différents mécanismes adaptatifs.

- les tests comportementaux, la mesure des performances de nages et de consommation d'oxygène. Ces mesures non invasives, classiquement utilisées en écologie comportementale et en physiologie du poisson permettent de caractériser le comportement des individus, et d'obtenir les capacités de nage et la dépense énergétique associée.

- la mesure du métabolisme cellulaire sur tissus prélevés après euthanasie des poissons. Ces mesures permettent de caractériser les mécanismes cellulaires d'adaptation aux nouvelles conditions environnementales.

Que ce soit la partie *in vivo*, via l'utilisation de tunnels de nage homologués, ou les mesures *in vitro*, l'ensemble des procédures seront réalisés grâce à du matériel de pointe récemment acquis.

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

- Remplacer : Ces études, qui visent à relier comportement, métabolisme énergétique in-vivo et in-vitro, doivent être réalisés sur des animaux. Concernant l'Apron du Rhône (espèce en voie d'extinction), il s'agit d'animaux issus d'un élevage scientifique, participant à une large étude de réintroduction. Quant au gobie à tâche noire, il s'agit d'animaux en pleine expansion car considérés comme invasifs.

- Réduire : le nombre d'individus utilisé a été réduit au minimum afin de permettre d'obtenir des résultats statistiquement appropriés aux objectifs. Le nombre présenté ici est le nombre maximal de poissons prévus pour mener à terme les expériences. Ce nombre pourra être ajusté à la baisse, si les plannings des protocoles le permettent.

-Raffiner : Les différentes phase du protocole (périodes de pré-conditionnement puis métabolisme in-vivo, performances de nage et bioénergétique cellulaire) sont bien établis chez les poissons et maîtrisés au laboratoire. Lors de l'exposition chronique aux différentes conditions, les poissons seront surveillés quotidiennement et dès l'apparition de signes de mal-être, l'individu sera sorti du protocole et remis en conditions standard d'élevage. De même, lors des protocoles non invasifs *in vivo* (mesure de la consommation d'oxygène associée aux performances de nage et tests comportementaux) un des principaux objectifs est de limiter au maximum la souffrance et le stress des animaux. Chaque geste contraignant (mesure et placement des poissons dans les tunnels de nage) sera réalisé sous anesthésie légère, suivi par un temps d'acclimatation de 12h. Les poissons seront 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. Au niveau des expériences de bioénergétique, les individus seront euthanasiés selon la réglementation en vigueur avant de prélever des échantillons tissulaires.

17450 Le cancer colorectal (CRC) représente un problème majeur de santé publique en France avec 36.000 nouveaux cas recensés chaque année. Le traitement a longtemps reposé principalement sur la chimiothérapie cytotoxique mais ces dernières années de profonds changements ont été opérés grâce au développement de thérapies ciblées ou biothérapies. Toutefois, ces traitements restent encore non efficaces dans un grand nombre de cas. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui participent au développement tumoral afin d'envisager des pistes thérapeutiques qui soient pertinentes. Il est maintenant bien établi que le développement du cancer colorectal résulte d'un dialogue complexe entre la cellule épithéliale intestinale, cible de la transformation tumorale et le système immunitaire ainsi que le microbiote. Notre projet a pour objectif d'étudier les fonctions de ces différents acteurs dans ce dialogue et seule une approche intégrée par l'expérimentation animale qui mime le développement du cancer colorectal est envisageable en raison de la diversité des types cellulaires présents dans la tumeur et de la complexité de leur interaction avec le micro-environnement.

Nous utiliserons deux modèles murins bien établis d'induction du cancer colorectal qui miment le développement de cette pathologie chez l'homme. Il s'agit (1) du modèle d'induction du CRC par injection répétée du carcinogène chimique, l'Azoxymethane (AOM) et (2) du modèle de développement du CRC associé à l'inflammation qui consiste en une injection d'AOM suivie par trois cures de Dextran Sulfate Sodium (DSS) dans l'eau de boisson qui permet d'induire une colite inflammatoire. Le suivi du développement tumoral induit sera effectué par échographie.

Nous utiliserons trois modèles murins génétiquement modifiés afin d'étudier l'impact des gènes d'intérêt sur le développement du cancer du côlon induit par le traitement AOM/DSS. Pour ce projet nous utiliserons au total 240 souris sur 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R et afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, une surveillance quotidienne sera effectuée et intensifiée pendant les phases potentiellement délétères. La

souffrance éventuelle des animaux sera estimée selon des critères précis. En cas d'atteinte des points limites définis, les animaux seront mis à mort de manière anticipée. 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 maisonnettes en carton et des cotons de nidification. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. L'échographie, sous anesthésie générale, permet un suivi de la croissance tumorale au cours du temps limitant ainsi très fortement le nombre d'animaux nécessaires. Un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions.

Ainsi les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du développement du cancer colorectal et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes.

17451 La souris de laboratoire représente 60% du total des animaux utilisés en recherche, et depuis une centaine d'années, son utilisation a permis de nombreuses avancées scientifiques. L'objet de ce projet est la production de souris ayant des caractéristiques génétiques particulières pour les besoins de la recherche.

Sur le plan génétique, cet animal est très similaire à l'être humain, ce qui en fait un modèle intéressant pour l'étude de la génétique humaine, et plus largement pour l'étude génétique des mammifères.

C'est un mammifère de très petit format à l'état adulte et assez facile à élever en captivité. C'est un rongeur avec une reproduction rapide, sans saisonnalité et qui supporte bien la consanguinité (c'est à dire que pour certaines lignées pures de souris, le patrimoine génétique est identique entre chaque souris au sein d'une même lignée). Les connaissances disponibles sur la séquence des génomes de souris ont permis de modifier le patrimoine génétique de cet animal, pour des besoins spécifiques de la recherche, grâce, entre autres, à la transgénèse. La création de modèles de souris transgéniques permet d'étudier la conséquence de la dérégulation de l'expression d'un gène sur l'animal dans son ensemble, au travers d'un ou plusieurs caractères observables (appelé également phénotype), mais également sur le métabolisme de tissus ciblés (où s'exprime ce gène en particulier). Ces analyses permettent de mieux comprendre la fonction d'un gène et d'expliquer comment sa dérégulation peut être à l'origine de certaines pathologies par exemple. L'obtention de souris transgéniques permet aussi la création de modèles précliniques de pathologies et d'essais de thérapies pour corriger les défauts observés avec des retombées potentielles en santé humaine et/ou animale. A ce jour il n'existe pas de modèle *in vitro* alternatif à l'utilisation de ces souris transgéniques.

Dans le cadre de nos activités de recherche, les modèles murins créés visent à valider le rôle suspecté de certains gènes dans l'apparition de maladies génétiques mais également à démontrer l'importance d'autres gènes dans le déterminisme génétique de fonctions d'intérêt zootechnique, telle la reproduction. Ils contribuent à mieux comprendre l'apparition de certaines pathologies, à détecter des marqueurs précoces de leur développement et à tester des approches thérapeutiques.

Une souris transgénique a acquis une modification de son génome suite à une manipulation expérimentale telle que la microinjection d'acides nucléiques (ADN ou ARN) dans des œufs au stade une cellule (cellule œuf) collectés chez des souris dites donneuses. La très grande majorité des cellules œufs ainsi micromanipulées survivent à la microinjection. Ces cellules œufs sont alors transférées dans une femelle dite receveuse pour terminer leur développement jusqu'à la naissance de souriceaux viables. Les individus qui ont incorporé dans leur génome une modification sont dits fondateurs (F0). Cette modification doit être transmise à la descendance de manière à pouvoir établir des lignées d'animaux transgéniques. On considère qu'environ 3% à 10% des cellules œufs microinjectées conduisent à la naissance d'une souris transgénique. La pratique régulière de la transgénèse dans notre laboratoire nous permet d'utiliser aujourd'hui le nombre minimum d'animaux nécessaires pour obtenir un animal transgénique. Pour diminuer le nombre d'animaux nécessaire à cette expérience, nous avons procédé à l'optimisation de différents paramètres. Par exemple nous utilisons une stimulation hormonale pour augmenter le nombre de cellules œufs par souris donneuse ou défini un poids idéal des souris receveuses pour maximiser le taux d'implantation embryonnaire. Pour un projet de transgénèse, nous devons obtenir au minimum 3 fondateurs. La création d'un modèle de souris transgénique pour un projet nécessite l'utilisation d'environ 70 à 80 souris. Nous envisageons de

répondre à 8 projets par an pendant la durée de l'autorisation de cette demande, ce qui devrait impliquer un nombre total de 2980 souris au maximum pour 5 ans.

Nous limiterons au maximum la souffrance des animaux avec l'utilisation de médicaments du type anesthésique et de molécules antidouleur lors du transfert chirurgical des cellules œufs chez les souris receveuses. Les femelles receveuses auront à disposition dans les cages, du matériel adapté pour fabriquer un nid comme des boules de coton, afin que la mise bas de ces animaux se passe dans les meilleures conditions possibles.

Une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée par les responsables du bien-être des animaux. Si un animal devait présenter des signes de douleur, de stress ou d'inconfort, comme une prostration, une absence de déplacement après une stimulation physique ou tout autre critère défini comme point limite, nous solliciterions le vétérinaire référent pour trouver une solution. Si aucune solution n'était envisageable, l'animal serait euthanasié.

17452 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 3e 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 Gougerot-Sjögren (SjS), la maladie de Crohn, etc. On distingue classiquement les maladies auto-immunes spécifiques, où les atteintes sont limitées à un organe particulier (par exemple, thyroïdites auto-immunes), et les maladies auto-immunes systémiques, telles que le lupus systémique érythémateux (SLE) ou le syndrome de Gougerot-Sjögren (SjS), qui atteignent plusieurs organes. Ces formes systémiques 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 (ex : 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 (corticoïdes, 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 sélection des patients dans de futurs essais cliniques 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 (petites molécules ou anticorps monoclonaux) contre ces cibles.

-Identifier et évaluer la pertinence de biomarqueurs dans ces modèles, pour permettre ensuite une meilleure sélection des patients et adapter les traitements à chaque population.

Les études incluses dans ce projet sont réalisées sur des souris et 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).

Remplacement : La recherche de nouveaux médicaments dans la prise en charge des maladies auto-immunes repose sur une première étape d'identification de candidats médicaments efficaces sur leur

cible au moyen de tests *in vitro*. Mais l'efficacité thérapeutique d'un candidat médicament ne peut être démontrée qu'après administration chez l'animal. Il est donc nécessaire que les molécules les plus abouties et les plus avancées dans leur développement soient administrées *in vivo*. De plus les pathologies auto-immunes sont par essence multifactorielles, impliquant un grand nombre de types cellulaires et de médiateurs, qu'il n'est donc pas possible de modéliser complètement *in vitro*. Le recours à l'animal est obligatoire pour connaître l'activité pharmacologique dans un organisme entier et vivant, impliquant l'ensemble des mécanismes physiopathologiques.

Réduction : A chaque étape clé du projet et pour chaque souche de souris, un accompagnement par le service biostatistiques sera programmée afin d'affiner design expérimentaux, estimation de la variabilité des paramètres et par conséquent nombre d'animaux nécessaires par groupe.

Par ailleurs, également dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, plusieurs biomarqueurs seront analysés et plusieurs organes classiquement atteints dans les pathologies auto-immunes seront prélevés sur une même souris, plutôt que d'étudier différentes symptomatologies dans des études séparées.

Raffinement : Toutes les souris de ce projet feront l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin. Ce suivi permettra d'identifier tout signe de souffrance et d'appliquer les mesures nécessaires au soulagement des animaux en cas d'atteinte de points limites prédéfinis. Il sera accru pour les lignées de souris génétiquement altérées susceptibles de présenter un phénotype dommageable. Les animaux disposeront de matériel de nidification ou de morceau de bois à ronger dans leur cage d'hébergement.

Ce projet permettra de valider de nouvelles cibles thérapeutiques et des 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.

Dans ce projet il est prévu d'utiliser au maximum 4950 souris sur une durée de 5 ans. Le nombre de rongeurs utilisé est calculé en fonction de la variabilité des paramètres examinés.

17453 Le cancer colorectal (CRC) représente un problème majeur de santé publique en France avec 36.000 nouveaux cas recensés chaque année. Le traitement a longtemps reposé principalement sur la chimiothérapie cytotoxique mais ces dernières années de profonds changements ont été opérés grâce au développement de thérapies ciblées ou biothérapies. Toutefois, ces traitements restent encore non efficaces dans un grand nombre de cas. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui participent au développement tumoral afin d'envisager des pistes thérapeutiques qui soient pertinentes. Il est maintenant bien établi que le développement du cancer colorectal résulte d'un dialogue complexe entre la cellule épithéliale intestinale, cible de la transformation tumorale et le système immunitaire ainsi que le microbiote. Notre projet a pour objectif d'étudier les fonctions de ces différents acteurs dans ce dialogue et seule une approche intégrée par l'expérimentation animale qui mime le développement du cancer colorectal est envisageable en raison de la diversité des types cellulaires présents dans la tumeur et de la complexité de leur interaction avec le micro-environnement.

Nous utiliserons deux modèles murins bien établis d'induction du cancer colorectal qui miment le développement de cette pathologie chez l'homme. Il s'agit (1) du modèle d'induction du CRC par injection répétée du carcinogène chimique, l'Azoxymethane (AOM) et (2) du modèle de développement du CRC associé à l'inflammation qui consiste en une injection d'AOM suivie par trois cures de Dextran Sulfate Sodium (DSS) dans l'eau de boisson qui permet d'induire une colite inflammatoire. Le suivi du développement tumoral induit sera effectué par échographie.

Nous utiliserons trois modèles murins génétiquement modifiés afin d'étudier l'impact des gènes d'intérêt sur le développement du cancer du côlon induit par le traitement AOM/DSS. Pour ce projet nous utiliserons au total 240 souris sur 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R et afin de limiter au maximum la souffrance des animaux, une surveillance quotidienne sera effectuée et intensifiée pendant les phases potentiellement délétères. La souffrance éventuelle des animaux sera estimée selon des critères précis. En cas d'atteinte des points limites définis, les animaux seront mis à mort de manière anticipée. 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 maisonnettes en carton et des cotons de nidification. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. L'échographie, sous anesthésie générale, permet un suivi de la croissance tumorale au cours du temps limitant ainsi très fortement le nombre d'animaux nécessaires. Un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions.

Ainsi les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du développement du cancer colorectal et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes.

17454 Les maladies cardiovasculaires sont les principales causes de décès dans les pays développés. L'incidence a augmenté dans la dernière décennie. Nous nous intéressons à 2 types de maladies associées aux vaisseaux : l'athérosclérose et l'anévrisme.

- L'athérosclérose est définie par une lésion de la paroi endothéliale interne des artères de gros et moyen calibre, favorisant un dépôt de cholestérol, de lipides, et une infiltration de cellules inflammatoires. Les cellules inflammatoires sont de deux types : innées et adaptatives. Elles infiltrent la lésion et participent à déstabiliser la plaque d'athérome jusqu'à la rompre, conduisant à une occlusion et une ischémie.

- L'anévrisme de l'aorte est une des principales causes de décès chez les personnes âgées. Elle est définie par une dilatation permanente de la paroi vasculaire dont le terme ultime est une rupture aortique. Elle est caractérisée par une déstructuration de l'architecture de la couche média de l'aorte, notamment par une perte des fibres élastiques, de macromolécules de la matrice extracellulaire et un remodelage des cellules musculaires lisses.

Notre objectif est de caractériser les cellules immunitaires impliquées dans la survenue précoce de ces maladies vasculaires et d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la déstabilisation de l'homéostasie du vaisseau.

Le but est de mieux comprendre la physiopathologie du vaisseau et d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques.

Les modèles expérimentaux seront la base de nos études. Nous utiliserons un modèle expérimental d'athérosclérose dans lequel le gène codant pour le récepteur du transporteur du cholestérol ou de l'apolipoprotéine E est délété.

Afin d'induire la formation de plaque d'athérosclérose, les souris seront alimentées avec un régime riche en gras et en cholestérol. Ces souris seront préalablement irradiées puis re-transplantées avec des cellules provenant d'une moelle osseuse de souris donneuses déficientes ou non pour le gène étudié.

L'induction de l'anévrisme ou de la rupture aortique se fera suite à une implantation en sous-cutanée d'une pompe qui diffusera une molécule vaso-constrictive ou suite à une laparotomie pour injecter localement une enzyme qui altère la matrice de l'aorte. Avant et durant la procédure chirurgicale, les souris seront anesthésiées sous isoflurane et elles recevront une solution analgésique de buprénorphine avant le réveil.

Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total 290 souris.

Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des 3R.

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'angoisse des animaux seront prises (Raffinement). Les chirurgies se feront sous anesthésie générale gazeuse et les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil complet. Aucune méthode alternative *in vitro* ne permet d'étudier ou de rendre compte de la complexité du système biologique *in vivo* impliqué dans le développement des

plaques d'athérome ou dans l'anévrisme et la rupture aortique (Remplacement). La méthode de mise à mort sera une dislocation cervicale précédée d'une anesthésie générale gazeuse.

17455 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. Malgré qu'il ait été montré qu'une combinaison d'ultrasons focalisés et d'immunothérapie menait à un meilleur contrôle de la croissance tumorale et à l'amélioration de la survie du modèle murin, la récurrence est tout de même présente. Afin de booster le système immunitaire pour éviter cette récurrence, nous souhaitons ajouter un agoniste TLR (Toll Like Receptor). Cependant, le temps de circulation du TLR sous sa forme libre étant réduite, une encapsulation dans une nanoplateforme au préalable sera mise en œuvre. Ceci aura pour but d'augmenter le temps de circulation et ainsi l'accumulation au niveau de la tumeur.

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. Le but, in fine, de cette étude est de caractériser le potentiel des ultrasons focalisés en complément d'une combinaison immunothérapie à remplir le rôle de traitement complémentaire pour améliorer la réponse immunitaire, via une induction de la réponse immunitaire.

Avant de pouvoir tester la combinaison de traitement complète, il est, tout d'abord, important de caractériser au mieux le système d'immunothérapie et plus particulièrement l'agent boostant qui va être injecté via une nanoplateforme. Cette dernière sera fluorescente et constituée de manière soit liposomiales soit polymériques car ce genre de nanoparticule est déjà très largement utilisés dans le domaine biomédical et le traitement des cancers. Le test de ces nanoplateformes sera effectué grâce à de l'imagerie de fluorescence. Ainsi, plusieurs voies d'administrations seront investiguées : intra-veineux ; intrapéritonéale et intra-tumoral.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier la biodistribution et le temps de circulation selon la voie d'administration. Le but étant d'avoir le vecteur le plus efficace qui se traduit par la meilleure accumulation des nanoparticules dans la tumeur.

La démarche 3R (Remplacement, réduction, raffinement) est appliquée : l'emploi d'un modèle *in vivo* est obligatoire car il s'agit d'étudier la réponse immunitaire dû au traitement et la biodistribution des nanoparticules, impossible à reproduire *in vitro* ; le nombre d'animaux sera réduit à minima, avec un nombre total de 216 souris pour 6 lots. Cependant, des études statistiques au cours du protocole seront effectuées et le protocole s'arrêtera dès que des résultats significatifs sont obtenus. Plusieurs formulations de nanoparticules ont été proposées mais ne seront pas toutes testées. En effet, la formulation de type liposome est privilégiée et seulement si les résultats ne sont pas concluants la formulation de type polymère sera alors testée. Ceci aura pour but de réduire au minimum le nombre d'animaux. 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 (nombre de souris par cage, ajout de cotons, ...) et toutes les précautions nécessaires seront prises afin que nos animaux soient le moins stressés possibles. Les traitements seront effectués sous anesthésie gazeuse et traitement antalgique afin de limiter au possible le stress

ou une possible douleur. Les souris seront injectées deux fois : une première fois pour l'inoculation tumorale avec un contrôle de la pousse tumorale et contrôle du poids tous les deux jours et la seconde fois pour l'injection des nanoparticules. Ensuite les souris seront observées dans les minutes/heures qui suivent sous anesthésie générale.

17456 Le système immunitaire, a un rôle très important dans le contrôle et l'élimination des tumeurs. Cependant au cours de la progression tumorale, les tumeurs développent de nombreux mécanismes d'échappement au système immunitaire. Un de ces mécanismes d'échappement est d'inhiber les fonctions des cellules effectrices du système immunitaire, ces cellules sont alors considérées comme « épuisées ». L'immunothérapie permet de réactiver et de stimuler le système immunitaire, par une vaccination avec des antigènes tumoraux ou par l'utilisation d'anticorps permettant de réactiver ces lymphocytes. L'immunothérapie a démontré son efficacité dans la prise en charge de nombreux cancers : mélanomes, cancer du poumon, du rein ou de la vessie. Néanmoins, l'efficacité de ces immunothérapies peut montrer ses limites chez certains patients. Un enjeu médical important est de mieux sélectionner les patients qui pourraient répondre à ces traitements, et d'avoir un marqueur permettant de suivre leur efficacité. Généralement, pour analyser ce type de biomarqueurs, il est nécessaire de réaliser une biopsie, qui peut être difficile pour des tumeurs profondes, et qui reste un geste invasif pour le patient. Il est nécessaire de définir des biomarqueurs dans le sang, prédictifs de l'efficacité et permettant de mieux cibler les patients.

Les cellules immunes « épuisées » expriment et relarguent des marqueurs sous forme solubles détectables dans le sang. Le but de notre projet est de montrer dans plusieurs modèles précliniques tumoraux murins, avec ou sans traitements, s'il y a une corrélation entre le niveau de ces marqueurs solubles circulants et leur expression dans le microenvironnement tumoral. 4 lignées de cellules tumorales différentes seront étudiées. Les souris seront greffées avec une lignée tumorale, vaccinées en association ou non avec un traitement d'immunothérapie à base d'anticorps. Du sang sera prélevé à différents temps pour faire des dosages dans le sérum. La croissance tumorale sera suivie 2 fois par semaine. Les souris seront sacrifiées 21 jours post greffe tumorale pour analyser la réponse immunitaire et étudier si l'efficacité des traitements est associée à une diminution de la concentration des marqueurs solubles circulants.

Le microenvironnement tumoral est complexe, de même que les réponses immunitaires impliquées au cours de la croissance tumorale. La dynamique de la réponse immunitaire et le microenvironnement tumoral ne peuvent être reproduits *in vitro*. C'est pourquoi il est nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux qui développent des pathologies qui se rapprochent le plus physiologiquement possible de celles de l'homme

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 et le microenvironnement tumoral.

Cette étude nécessite 1584 souris pour une période de 5 ans.

Nos travaux s'inscrivent dans une dynamique de réduction de l'utilisation d'animaux, de mesures de raffinement des conditions expérimentales afin de garantir le bien-être des animaux. 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. Afin de réduire ce nombre nous avons déterminé certains paramètres expérimentaux (stratégies vaccinales, modèles tumoraux, nombre de cellules à implanter, nombres d'animaux suffisants pour des études statistiques) selon 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. Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté et suivis quotidiennement. Pour chaque procédure afin de limiter la souffrance animale, des points limites et des critères d'arrêt sont définis. L'euthanasie anticipée de l'animal sera effectuée en cas d'atteinte de ces points limites.

Les résultats de ce projet pourraient valider ces récepteurs inhibiteurs solubles comme biomarqueurs circulants chez l'homme, pour évaluer d'une part la résistance à l'immunothérapie et de l'autre l'efficacité du traitement, sans avoir recours à une biopsie.

17457 Durant la gestation, un faible nombre de cellules foetales passe dans la circulation maternelle tout au long de la grossesse chez tous les mammifères ; ces cellules sont bien tolérées et persistent des décennies après la mise bas en se nichant dans la moelle osseuse de la mère. Des études ont montré que ces cellules pouvaient quitter la moelle maternelle et migrer vers un tissu maternel lésé (foie, cerveau, cœur, peau et autres) pour participer à sa réparation.

Notre équipe s'est intéressée au rôle de ces cellules foetales dans la cicatrisation cutanée. Des travaux antérieurs ont mis en évidence l'implication de la voie de signalisation CCR2/CCL2 dans la mobilisation des cellules foetales au sein des plaies maternelles. L'équipe veut à présent tester l'effet de ces cellules sur d'autres lésions maternelles que la peau tel que le cerveau. Le but de ce projet est donc d'évaluer, chez des souris post-gestantes, l'effet de CCL2 sur la réparation de lésions cérébrales à travers le recrutement de cellules foetales.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 200 souris. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans la cicatrisation.

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 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 et des soins adaptés.

17458 Les naevi congénitaux (NC) sont des tumeurs bénignes de taille variable présentes dès la naissance et d'origine mélanocytaire. Les mélanocytes qui constituent ces tumeurs bénignes infiltrent l'épiderme et le derme.

Certains NC (NC de grande taille ou NCG) peuvent atteindre plus de 20 cm à l'âge adulte. Ces lésions de grande taille ont un retentissement socio-esthétique majeur chez l'enfant. De plus, elles sont à risque de dégénérescence en mélanome, tumeur maligne très agressive. Ce risque de transformation maligne augmente avec la taille de la lésion.

L'excision chirurgicale est à l'heure actuelle le seul outil thérapeutique disponible. Il a été montré qu'un type de mutation génétique était capable d'induire un NC de grande taille. De plus, des cellules mélanocytaires à caractère « souche » ont été mises en évidence au sein de ces tumeurs bénignes. Par ailleurs, certaines voies de signalisation affectant la survie et la prolifération cellulaire sont suractivées dans les naevocytes de NCG.

L'objectif de ce travail est de tester *in vivo* (xénogreffes de tissus humains naeviques sur souris immunodéprimées) différents inhibiteurs des voies de signalisation identifiées dans le but de développer un traitement médical intralésionnel innovant dans ces tumeurs de l'enfant.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 300 souris. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans la cicatrisation.

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 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 et des soins adaptés.

17459 L'hypophosphatémie liée à l'X (XLH) est la cause la plus fréquente de rachitisme d'origine génétique (1/20 000). Elle résulte d'une mutation inactivatrice du gène PHEX (Phosphate-regulating gene with homology to endopeptidases on the X chromosome). Les patients présentent une altération de la croissance associée à de sévères déformations des membres inférieurs, des défauts de minéralisation, des déformations du crâne et des infections dentaires à répétition. La thérapie actuelle consiste en une supplémentation en phosphore et en une forme active de la vitamine D. Administré principalement pendant la croissance, ce traitement cible la phosphatémie et a pour but d'améliorer la croissance, la santé buccodentaire et les douleurs osseuses. Cependant il ne corrige pas les anomalies locales de la matrice osseuse et dentinaire. A l'âge adulte, les patients développent un taux élevé d'atteintes parodontales conduisant à des pertes dentaires affectant leur qualité de vie de façon significative. A ce jour, les stratégies thérapeutiques ne permettent pas de répondre à la demande du patient de manière prédictive.

Notre projet vise à analyser les mécanismes sous-jacents aux défauts de minéralisation lors de l'ostéo-intégration implantaire dans un organisme modèle de la pathologie humaine, la souris Hypophosphatémique Hyp (reproduisant les manifestations de l'XLH (petite taille, ostéomalacie)). Nous comparerons l'ostéointégration chez des souris Wild type et des souris Hyp avec et sans traitement conventionnel.

Durant le temps des expériences, les souris seront surveillées quotidiennement et des mesures prises afin de réduire la douleur si elle est détectée. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au nombre minimum nécessaire et suffisant pour permettre l'analyse statistique des données, et le suivi longitudinal permettra de raffiner la méthodologie. Au total 210 souris seront utilisées.

L'utilisation d'animaux nous permettra d'avoir une vue d'ensemble et une meilleure compréhension i) du processus physiopathologique conduisant aux manifestations osseuses lors de l'ostéo-intégration et ii) de ses traitements, qui ne peuvent être appréhendés dans des modèles *in vitro*. Notre projet permettra une meilleure compréhension de la physiopathologie des hypophosphatémies. Ceci pourrait permettre à terme le développement de nouvelles thérapeutiques.

17460 Le stress psychologique répété est un facteur de risque pour le développement de pathologies chroniques. Les mécanismes impliqués restent encore à être identifiés mais peuvent faire intervenir des modifications des fonctions de la barrière épithéliale intestinale, du microbiote intestinal et aussi un dysfonctionnement immunitaire.

Notre hypothèse est que le stress chronique pourrait favoriser le développement du cancer colorectal (CCR), en synergie avec un contexte environnemental mutagène. Dans un premier temps, nous étudierons l'effet d'un stress psychologique chronique chez la souris sur le développement tumoral, en utilisant un modèle de carcinogenèse induite par un agent mutagène (l'azoxyméthane). Dans un second temps, afin d'identifier de potentiels mécanismes responsables, nous étudierons l'effet du stress sur la réponse de l'épithélium intestinal, au niveau moléculaire (transcriptome) et fonctionnel (capacité proliférative) et les déséquilibres du microbiote associés à ces effets. Ce projet permettra

d'identifier le stress comme nouvel acteur dans l'initiation du CCR et ouvrira également des pistes pour l'étude des mécanismes impliqués dans ces effets pour la poursuite de cette étude.

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). Les souris seront conservées dans des cages de taille suffisante, et avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Le bien-être des souris sera surveillé tout au long de l'étude tous les jours, avec mise en place d'un enrichissement par fricotis, 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.

Une 1ère étude sera réalisée pour déterminer les meilleures conditions puis les expériences seront reproduites 2 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera au total, 192 animaux (souris A/J).

17461 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les probiotiques. Les probiotiques sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Lors d'une étude précédente, l'analyse du microbiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose a permis de mettre en évidence un genre bactérien particulier : *Porphyromonas*. Ce genre bactérien, et plus particulièrement *Porphyromonas catoniae* (PC), semble être prédictif de l'infection à PA. Il a été montré chez ces patients, que ceux qui avaient moins de *Porphyromonas* dans les poumons, avaient plus de risque de se coloniser à PA. Par la suite, il a également été montré que la quantité de PC pulmonaire venait à diminuer, voire disparaître, préalablement à la colonisation à PA alors que PC restait stable chez les patients non colonisés. Précédemment, nous avons testé une souche de référence de *Porphyromonas catoniae* or des souches isolées de patients atteints de mucoviscidose sembleraient plus efficaces *in vitro* et nécessitent d'être testés *in vivo*. Pour cela, l'étude proposée se déroulera de la manière suivante : les souris recevront une première instillation par voie intranasale de PC ou de sérum physiologique à usage vétérinaire (9g/L). Cette instillation est préventive à l'infection à PA également administré de manière intranasale 18 heures plus tard. Nous utiliserons 54 souris afin de mener à bien cette expérimentation. La quantité résiduelle de PA sera recherchée par culture bactérienne de manière à pouvoir comptabiliser le nombre de bactéries vivantes et cultivables restantes dans le poumon à 24h.

L'objectif est de confirmer un potentiel effet probiotique de PC clinique vis-à-vis de PA.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet une seule espèce de *Porphyromonas* clinique a été sélectionnée grâce aux analyses précédentes réalisées *in vitro* (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 (permettant de maintenir la température corporelle de la souris lors de la phase de réveil) durant toute la durée de la procédure) (principe de raffinement).

17462 Chez l'homme, les cancers du poumon en France sont responsables du plus grand nombre de décès (environ 20 800/an). Les tumeurs se caractérisent par une grande hétérogénéité intra- et inter-individu. Or, jusqu'à présent, les modèles d'étude préclinique se basent sur les lignées cancéreuses qui ne reflètent pas cette hétérogénéité. Ainsi, malgré le développement de cultures 3D dont la mise en œuvre reste difficile, les modèles animaux s'avèrent toujours indispensables. L'approche par greffe chez la souris immuno-déficiente de tissus sains avec des organoïdes formés à partir des tumeurs humaines obtenues à partir de patients lors de la chirurgie, apparaît comme un modèle d'étude très pertinent. La

souris athymic nude est une souris de laboratoire provenant d'une lignée présentant une mutation génétique naturelle qui cause une absence totale ou partielle du thymus, ce caractère s'accompagne d'un système immunitaire déficient dû au nombre réduit de lymphocytes T produits.

Les tumeurs de patients seront dissociées puis réassociées pour former des organoïdes. Ces organoïdes seront injectés dans un fragment de poumon sain du même patient implanté chez des souris immuno-déficientes juste après prélèvement chez le patient. Nous étudierons le développement et la vascularisation de ces organoïdes mimant la tumeur dans du tissu sain. Des organoïdes formés à partir du tissu sain serviront de témoins. Les implantations seront réalisées sous anesthésie générale. L'ensemble de ce projet utilisera au maximum 1000 souris nude sur la période de 5 ans.

La règle des 3R sera respectée :

-Remplacement : La réalisation d'études précliniques fiables nécessite l'utilisation de modèles animaux reproduisant fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines : grande variabilité cytogénétique entre les individus et hétérogénéité au sein même de la tumeur.

-Réduction : Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés pour les différentes implantations par patient à 4. Nous recueillerons par an les tumeurs et tissus sains d'environ 50 patients pour les cancers du poumon. Ainsi sur les 5 ans, nous recueillerons environ 250 tumeurs. Étant limité par la quantité de matériel biologique, le prélèvement initial (issu du patient) sera greffé sur 4 souris (5 implants par souris). Pour l'établissement des modèles 1000 souris seront donc nécessaires pour les 5 ans de ce projet.

-Raffinement : Le raffinement sera assuré par un enrichissement des cages pour le confort des animaux (des bâtons à ronger pour limiter les querelles ; des carrés de coton pour une nidification ; des igloos, permettant le jeu et le repos). Les souris seront nourries et hébergées en groupe ; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif avec induction de plaies. Nous diminuerons la douleur et l'angoisse liées à la greffe en opérant sous anesthésie et en appliquant une analgésie locale au réveil, phase pendant laquelle les animaux seront surveillés. Il est à noter que le développement tumoral n'est pas douloureux pour les animaux. De plus, nous avons établi des points limites qui mettront fin à l'expérimentation en cas de souffrance et d'inconfort des animaux.

17463 La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus fréquente. Elle est caractérisée par des troubles de la mémoire et du comportement, ainsi que par une désorientation dans le temps et dans l'espace et touche aujourd'hui 50 millions de personnes dans le monde, dont plus de 1 000 000 en France. Son incidence augmente très fortement avec l'âge (de 1,5 % de la population âgée de 65 ans, elle double tous les ans pour atteindre 30 % dans la tranche des 80 ans et plus).

La maladie d'Alzheimer engendre rapidement une dépendance physique, intellectuelle et sociale majeure, qui retentit sur l'entourage. Elle représente la principale cause de dépendance et de placement en institut spécialisé (40 % des malades sont dans cette situation). Le manque de médicaments efficace contre la maladie représente un défi majeur de santé humaine.

L'objectif de ce projet est d'évaluer plusieurs candidats médicaments dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer basé sur l'injection stéréotaxique du peptide amyloïde. Ce peptide est directement mis en cause dans la progression de la maladie chez les patients.

Ce projet nécessitera un total de 228 souris âgées de 18 mois, réparties en 4 procédures indépendantes. Les candidats médicaments seront administrés par voie orale (gavage). Les capacités cognitives des souris seront évaluées grâce à des tests comportementaux. A la fin de l'étude, les souris seront mises à mort en vue de collecter le cerveau pour des études histologiques.

L'étude comporte donc 4 procédures indépendantes, une par série de composés. Au cours de ce projet, une attention particulière sera apportée au respect de la règle des trois Rs.

Remplacement : Les processus pathophysiologiques de la maladie d'Alzheimer impliquent l'interaction de plusieurs types cellulaires (neurones et cellules gliales) dans différentes structures cérébrales. Ce degré de complexité ne peut être atteint qu'avec un modèle animal.

Pour la Réduction : Le nombre de souris (n par expérience) sera optimisé pour assurer l'obtention de résultats statistiquement significatifs. À cette fin, des études antérieures disponibles dans la littérature

scientifique suggèrent un nombre minimal de 12 souris par groupe, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs en termes de (i) détérioration des fonctions cognitives se traduisant par une perte de mémoire spatiale, et (ii) % de neurones morts (neurodégénérescence); deux caractéristiques essentielles et déterminantes dans la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, pour ce projet, nous travaillerons avec n=12 souris par groupe pour détecter d'éventuels effets significatifs de candidats médicaments dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer.

Pour le Raffinement : nous incluons des procédures visant à améliorer le bien-être des animaux, en nous basant sur : (i) la présence d'objets d'enrichissement, (ii) des stratégies d'analgésies pré, pendant et après l'opération, (iii) et le contrôle strict des besoins physiologiques des animaux (température corporelle) pendant et après l'opération (pour assurer un rétablissement rapide). Les animaux seront hébergés par deux au minimum (5 au maximum), en cages ventilées, avec accès ad libitum à l'eau et à la nourriture.

Ce projet expérimental s'intègre dans une stratégie de développement de candidats médicaments pour le traitement des patients atteints par la maladie d'Alzheimer.

17464 L'hypercalciurie (excès de calcium dans l'urine) est le principal facteur de risque de développer des calculs rénaux. Pour comprendre la physiopathologie de la maladie humaine, nous avons étudié un modèle de rat (le rat GHS) qui a les caractéristiques de la maladie humaine. Au cours de cette étude, nous avons pu localiser un segment dans le rein, la branche large ascendante de l'anse de Henle, où le transport de calcium est anormalement bas chez les animaux GHS par comparaison aux animaux témoins. La raison de ce défaut de transport de calcium est probablement une résistance aux effets de la vitamine D. En effet, le récepteur de la vitamine D semble anormalement peu exprimé dans ce segment chez les animaux malades. Nous avons observé que le récepteur de la vitamine D contrôle effectivement l'expression de certaines protéines importantes pour la conservation du calcium par le rein : ces protéines font partie de la famille des Claudines. Elles se situent dans les jonctions intercellulaires et permettent le passage du calcium de l'urine vers le sang. Ces résultats ont été soumis pour publication à un journal scientifique spécialisé qui nous demande des expériences complémentaires : confirmer que le récepteur de la vitamine D est anormalement peu exprimé la branche large ascendante de l'anse de Henle et confirmer que le récepteur de la vitamine D contrôle l'expression des claudines. La réponse au premier point ne nécessite que de prélever les reins de mâles normaux et GHS pour quantifier l'expression du récepteur. Le second point nécessite d'injecter de la vitamine D active à 10 rats mâles hypercalciuriques et 10 rats mâles témoins pendant trois jours, par voie intrapéritonéale, puis nous prélèverons les reins pour étudier l'effet de la vitamine D active sur l'expression des gènes de ces protéines et leur localisation dans le rein. Dix rats mâles témoins et dix rats mâles GHS seront injectés avec le solvant sans vitamine D active pour servir de contrôle. Cette étude permettra de déterminer si l'expression des gènes de ces protéines est effectivement sous la dépendance de la vitamine D et si la réponse à la vitamine D est différente chez les rats hypercalciuriques et les témoins, ce qui serait une avancée considérable dans la compréhension de la maladie.

La règle des 3R a été appliquée du mieux possible lors de l'élaboration du protocole d'étude. Il n'y a pas d'alternative à cette étude, les modèles cellulaires existant ne permettant pas de rendre compte de la complexité du fonctionnement du tissu rénal intact. Le nombre d'animaux par groupe a été calculé en tenant compte de la variabilité des paramètres d'intérêt en fonction des conditions expérimentales afin de réduire autant que possible le nombre d'animaux utilisés (réduction). Soixante animaux (30 témoins et 30 GHS) sont utilisés dans le projet (10 de chaque pour le premier point et 20 de chaque pour le second point). Les mesures réalisées tiennent compte de l'état de l'art de manière à avoir la meilleure performance des mesures réalisées. Les animaux bénéficient d'un environnement enrichi et leur souffrance est prise en compte et atténuée au maximum (raffinement).

17465 Les sarcomes des tissus mous représentent un groupe hétérogène de tumeurs (70 types différents) affectant chaque année 4500 adultes et enfants, le décès survient dans près de 50% des cas parce qu'il y a très peu de traitements à la disposition des médecins.

En effet, à l'heure actuelle, de nombreuses thérapies ciblées sont développées et testées chez des patients atteints de cancer (colon, sein, poumon...) mais peu d'essais sont réalisés chez des patients atteints de sarcome à cause de la rareté des modèles pré-cliniques (cellules *in vitro* et modèles de souris). Le développement de modèles pré-cliniques pour l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques représente donc un enjeu crucial.

Notre équipe est spécialisée dans le traitement de ce cancer rare et nous avons donc la possibilité d'obtenir des tumeurs de patients et ainsi de pouvoir développer des lignées cellulaires et des modèles de souris xénotransplantés avec ces tumeurs de patients. Celles-ci vont nous permettre de tester des médicaments et des combinaisons de médicaments pour lesquels nous avons des données bibliographiques dans d'autres types de cancer. Les tests seront d'abord réalisés sur des cellules en culture et dans la mesure où ils sont concluants, ils seront réalisés sur des souris sur lesquelles on aura implanté une tumeur de patient. Nous souhaiterions avoir une collection de ces souris implantées représentatives des différents types de sarcome des tissus mous : liposarcomes différenciés (LPS), leiomyosarcome (LMS), sarcomes pléomorphes indifférenciés (UPS), sarcomes épithélioïdes...

La règle des 3R est respectée :

Réduction : le nombre de souris est limité au maximum (3 souris par tumeur pour l'établissement du modèle)

Raffinement : toutes les expérimentations sont réalisées par du personnel qualifié, les animaux sont surveillés par le personnel de l'animalerie quotidiennement et sont hébergés dans des cages comprenant une nourriture adaptée et enrichies par plateformes et cabanes rouges et du cocoon

Remplacement : Ces expérimentations *in vivo* s'inscrivent dans un projet de recherche translationnelle qui vise à élargir l'éventail thérapeutique dans le traitement des sarcomes des tissus mous, elles sont essentielles avant de pouvoir réaliser les essais chez l'homme.

Ce projet prévoit l'utilisation de 4620 souris sur 5 ans

17466 Ce projet vise à étudier les origines des maladies psychiatriques, particulièrement l'anxiété et la dépression induites par le stress. Ces types de maladies psychiatriques sont un enjeu de santé majeur. Il n'y a pas à l'heure actuelle de connaissance des causes neurologiques qui sont à la base de ces maladies et nous n'avons pas de biomarqueurs comme moyen de les dépister, ni même de les diagnostiquer correctement. Le ministère de la santé ainsi que l'OMS ont envoyé des messages forts, rappelant l'urgence d'agir face à ces maladies dévastatrices. Ce projet vise à découvrir des biomarqueurs pouvant aider à reconnaître de manière précoce les maladies psychiatriques et de découvrir les acteurs clés des circuits neuronaux impliqués dans ces maladies. Pour cela un protocole de stress générant des susceptibilités aux maladies psychiatriques sera établi et des urines et des selles seront collectées le long de ce protocole. Le profil psychiatrique de chaque souris sera ensuite confronté aux données moléculaires pour trouver des signatures de ces profils. Des études du cerveau seront réalisées aux niveaux anatomique, moléculaire et électrophysiologique pour comprendre les causes. Enfin nous étudierons l'interaction qu'il existe entre les gènes et le stress environnementale. Ceci est une étape clé pour permettre de vérifier quels circuits neuronaux sont impliqués et de comprendre l'impact des gènes de susceptibilité aux maladies psychiatriques sur les processus pathologiques. Le modèle souris dans ce projet est essentiel car il est le modèle animal le mieux adapté pour permettre de rendre compte des maladies aussi complexes que les maladies psychiatriques. Ce projet respectera la règle des trois R.

Raffiner : Outre les conditions d'hébergement réglementaires, 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 oeuvre de points limites précoces et adaptés. Nous utiliserons des anesthésiques et des anti-inflammatoires non stéroïdiens pour prévenir la douleur et l'inflammation.

Réduire : Nous limiterons la taille des échantillons à ce qui est strictement nécessaire pour garantir une puissance statistique acceptable.

Remplacer : Il ne sera pas possible de remplacer le modèle souris mais beaucoup de données expérimentales, notamment les données électrophysiologiques, seront obtenues *in vitro* sur des

tranches de cerveau. Des lignées cellulaires seront employées pour valider les différents outils génétiques et moléculaires avant leur emploi *in vivo*.

Nous estimons avoir besoin au maximum de 5536 animaux sur les 5 ans de ce PEA.

17467 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. 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 les informations reçues depuis le gyrus denté n'ont pas encore été testés. Le projet propose d'étudier (i) le fonctionnement des neurones de CA3 *in vivo* lors de différents états de veille et (ii) le rôle joué par les informations reçues depuis le gyrus denté, à l'aide d'enregistrements de neurones chez la souris éveillée. Il est 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. 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 à l'échelle cellulaire ainsi qu'à l'échelle plus globale du réseau de neurones. Cette étude est la première à étudier l'activité des cellules de CA3 chez l'animal éveillé dans un contexte physiologique. Elle permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires à l'origine de l'encodage et la consolidation de la mémoire.

Dans un premier temps, nous compléterons les données déjà récoltées et analysées au laboratoire concernant l'activité et la dynamique des neurones de CA3 lors de différents états de veille. Les données obtenues montrent une importante modulation de l'activité des neurones en fonction de différents états cérébraux. Nous souhaitons donc compléter ces données et effectuer d'autres mesures qui permettront d'élucider les différents mécanismes cellulaires à l'origine de ces modulations.

Nous souhaitons ensuite 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 (1/3 du projet). Sur le temps restant, 340 animaux seront utilisés pour effectuer des mesures électrophysiologiques. 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 2 animaux sur 3 en moyenne. Pour pouvoir effectuer des analyses statistiques robustes, nous savons qu'environ 20 cellules sont nécessaires/groupe. 130 de ces animaux seront utilisés pour étudier l'impact de l'inhibition du gyrus denté sur l'activité de CA3. Les 210 autres animaux seront utilisés pour compléter l'étude qui a déjà commencé au sein du laboratoire et qui faisait déjà l'objet d'une autorisation de projet concernant l'activité des cellules de CA3 en fonction de différents états de veille et comportementaux.

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 340 souris sur 3 ans. 130 seront utilisées pour l'inhibition du gyrus denté, et 210 seront utilisées pour l'étude en conditions physiologiques des neurones de CA3 en fonction de différents états comportementaux et de veille. Si cela est possible, le nombre d'animaux sera revu à la baisse, en cours d'expérimentation.

17468 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune fréquente, caractérisée par la présence d'auto-anticorps et une inflammation importante. Elle est responsable de destructions articulaires ainsi que d'une atteinte cardiovasculaire entraînant une augmentation de la mortalité. On y retrouve des anomalies de la flore intestinale, du système cardiovasculaire et du cerveau. Elle survient sur un terrain génétique favorable en présence de facteurs environnementaux. L'alimentation et la flore intestinale semblent jouer un rôle important. On sait que la communication entre l'intestin, le cerveau et la flore intestinale peut ainsi moduler réciproquement leur physiologie. L'objectif de ce projet est d'étudier comment les changements de flore intestinale chez des patients atteints de PR influencent l'organisme (intestin, cœur et système nerveux). Pour cela, nous utiliserons des souris au microbiote humanisé grâce au transfert de flore intestinale de patients car aucun modèle alternatif n'est disponible dans ce contexte.

Nous étudierons les conséquences à l'échelle de l'organisme d'un transfert de flore intestinale de i) sujets sains et ii) de sujets atteints de PR avant et iii) après régime alimentaire ou probiotique. Ces transferts seront faits dans des souris males saines et des souris arthritiques. Nous utiliserons deux modèles murins d'arthrite : aigu, induit par injection d'auto-anticorps, et chronique, induit par injection de collagène. L'impact cardiovasculaire de la flore transférée aux souris sera étudié par mesure de l'électrocardiogramme (télémétrie) et par échographie cardiaque. L'évaluation immunologique et neurologique se fera après le sacrifice. Pour évaluer le rôle du système parasympathique dans les effets observés, nous utiliserons des souris déficientes pour le récepteur contrôlant ce système. Cette étude sera conduite sur 475 animaux 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. 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 tout au long du protocole.

17469 Le projet a pour but d'étudier la régénération du tissu osseux sur des modèles animaux avec des implants synthétiques contenant des composés actifs sur le plan biologique. En effet, la régénération osseuse est un processus complexe et nécessite parfois l'utilisation de matériaux de comblement (substituts osseux). Les traitements disponibles actuellement consistent à utiliser des substituts osseux, en combinaison avec des tissus propres au patient (tissus autologues), des techniques de greffe osseuse ou des dispositifs implantaires. Dans les cas complexes de maladies articulaires, il est parfois nécessaire de remplacer une articulation complète par une prothèse. Notre objectif est donc d'optimiser la régénération osseuse après une intervention chirurgicale en développant des implants contenant des molécules présentant des activités biologiques ou des cellules souches (implants vivants de troisième génération). Après des études *in vitro*, notre projet consistera à étudier *in vivo* sur modèle animal les performances des implants en termes de biocompatibilité, de toxicité et d'efficacité. Nous devons également optimiser des dispositifs approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) qui est l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux. Ce projet consiste donc à valider

sur des modèles animaux des implants pouvant se résorber dans l'organisme et obtenus par la technologie d'impression 3D qui seront utilisés pour le traitement des lésions osseuses. Un autre volet du projet visera à étudier le développement de germes dentaires issus d'embryons de souris cultivés en laboratoire et implantés en site osseux en présence de biomembranes et de ganglions nerveux. Le choix des animaux s'est porté sur le modèle de référence classiquement utilisé de la souris, pour ce qui est de l'étude de la régénération osseuse au niveau de la mâchoire, du crâne ou du squelette. Nous implanterons nos biomatériaux et germes dentaires sur le modèle animal de souris, afin de reproduire les futures conditions d'utilisation prévues pour leur application chez les patients.

Le rat sera utilisé en tant que modèle de lésion ostéo-articulaire, car il est plus adapté concernant la taille des lésions et des implants et permet d'améliorer les phases chirurgicales, ainsi que l'interprétation des résultats obtenus.

Le nombre total d'animaux utilisé pour l'ensemble des procédures sera au maximum de 2580 (2220 souris et 360 rats) et a été déterminé en se conformant à la règle des "3 R" :

1/ "REDUCTION" des effectifs liés à une approche statistique adéquate et à l'utilisation de modèles standardisés. De plus, uniquement les implants validés chez la souris pour une réparation osseuse seront testés pour une réparation ostéo-articulaire chez le rat, d'où la réduction du nombre maximum de rats évalués pour ces études.

2/ "RAFFINEMENT" prenant en compte le bien-être des animaux. Tous les actes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale. De plus, une anesthésie locale et des traitements antidouleurs seront effectués pour réduire la douleur post-opératoire, en accord avec les principes d'éthique de la recherche animale. Compte tenu des potentielles douleurs pouvant être générées suite aux actes chirurgicaux en site ostéo-articulaire chez le rat, un suivi rigoureux après l'intervention et une prise en charge précoce de la douleur seront effectués, en cas de signes de souffrance animale. Les animaux « nude » (immunodéprimés) seront hébergés dans des conditions optimales (6 par cage maximum. Pour l'ensemble des animaux un enrichissement du milieu (tunnels, bâtonnets, nids, coton...) sera ajouté dans les cages. Si les animaux implantés au cours de l'étude présentent des signes précoces de douleur, d'inconfort ou de détresse (changements de comportement : animal prostré et isolé du reste du groupe, perte de poids et d'appétit ou gonflement de l'articulation en cas d'implantation intra-articulaire), l'expérimentation sera stoppée.

3/ "REMPLACEMENT". Après des études *in vitro* poussées validant l'efficacité des implants, il est nécessaire de passer à des études *in vivo* étant donnée la complexité de l'environnement osseux et ostéoarticulaire.

17470 La production de glucose par l'intestin est une fonction bénéfique pour l'équilibre glycémique, qui, via un relais nerveux, contrôle les fonctions de certaines régions du cerveau (dont l'hypothalamus). Ce relais nerveux est initié dans la veine porte par la détection de glucose après la digestion complète. Cette détection active un signal qui transite par le système périphérique et cible le tronc cérébral.

L'objectif de ce projet est de déterminer 1/ comment la détection du glucose est réalisée dans la veine porte, et 2/ identifier la voie nerveuse impliquée. Le peptide CGRP (Calcitonin gene related protein) est une cible principale car ce peptide est impliqué dans la transmission des informations sensibles périphériques au cerveau.

Nos études seront réalisées chez la souris adulte de type naturel ou invalidée pour le CGRP. Chez ces souris, la production de glucose par l'intestin sera induite par un régime enrichi en protéines ou sera mimée par une perfusion de glucose directement dans la veine porte. Les souris perfusées en veine porte seront libres de leurs mouvements.

Les prélèvements de tissus permettront d'étudier si l'induction de la production intestinale de glucose modifie l'expression des transporteurs de glucose en zone portale et modifie l'activité nerveuse des ganglions périphériques. Les mêmes études seront réalisées sur des souris invalidées pour CGRP pour déterminer l'implication de ce peptide dans l'activation des neurones périphériques. Au cours études préalables, aucune modification qui pourrait diminuer le bien-être animal n'a été constatée lors d'une alimentation enrichie en protéines ou après invalidation de CGRP.

Ces résultats permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'axe intestin-cerveau et de démontrer l'importance de la production intestinale de glucose en tant que fonction essentielle à la transmission de l'état nutritionnel à l'hypothalamus.

Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) :

Remplacement : Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation d'animaux pour ce projet. En effet, le glucose produit par l'intestin est détecté au niveau de la veine porte qui va transmettre un signal nerveux jusqu'au cerveau. Ce mécanisme impacte l'ensemble de l'organisme et implique des dialogues entre organes.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été calculé au plus juste afin d'être réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation, avec un maximum de 192 souris sur une période de 3 ans.

Raffinement : Toutes les mesures seront prises pour préserver le bien-être de l'animal. Les souris seront élevées et hébergées par groupe en milieu enrichi pour favoriser la nidation (coton de nidation, bois à ronger). L'implantation du cathéter dans la veine porte pour la perfusion de glucose sera réalisée sous anesthésie gazeuse avec un traitement analgésique et antalgique adapté pendant plusieurs jours afin de limiter la souffrance, la douleur et le stress de l'animal pendant et après cette chirurgie. Les animaux seront observés et pesés régulièrement. Des signes de maladie, de perte de poids, de souffrance, de lésions ou de détérioration de l'état de santé général constituent des points limites au-delà desquels les souris sont mises à mort.

17471 La consommation d'alcool provoque des dommages importants sur la santé. Ainsi le nombre de décès liés à l'alcool en France est estimé à près de 50 000 par an. Les profils de consommation d'alcool sont variés, de la simple habitude récréative au trouble d'usage de l'alcool. Cette dernière pathologie toucherait 4 à 5% de la population générale en France. Il s'agit d'un trouble d'addiction pour lesquels les solutions thérapeutiques sont peu nombreuses. L'objectif de ce projet est de faire la preuve que l'apomorphine, médicament actuellement prescrit dans la maladie de Parkinson, permettrait de réduire la consommation d'alcool chez des souris rendues fortes consommatrices. En effet, un large faisceau d'arguments (historiques, précliniques, cliniques, pharmacologiques et neurobiologiques) est en faveur du repositionnement de l'apomorphine dans les addictions, et en particulier dans l'alcoolisme. L'hypothèse est que l'apomorphine agirait au travers d'un mécanisme de réduction et/ou suppression de l'envie de consommation d'alcool.

Au total 100 souris seront utilisées. Dans une première étape, un modèle d'hyperconsommation d'alcool issu de la littérature sera reproduit. Pour cela, 30 souris C57BL/6J âgées de 6 semaines seront placées en cages individuelles pendant 13 semaines. Une hyperconsommation d'alcool sera induite chez 10 souris en les mettant sous régime riche en lipides et en sucre (HF-HS) pendant 8 semaines puis sous régime standard avec accès à une solution d'alcool 10% et à de l'eau à ce moment-là. Ce changement d'alimentation devrait provoquer chez la souris une forte consommation d'alcool perdurant au moins 4 semaines. En parallèle, deux groupes de 10 souris serviront de témoin : un groupe recevra l'aliment standard pendant 12 semaines et un autre l'aliment HFHS pendant 12 semaines. Ces deux groupes auront accès à de l'eau pendant les 8 premières semaines puis une solution d'alcool 10% et de l'eau (ces 2 groupes de souris ne devraient pas présenter de consommation excessive d'alcool, voire même une aversion). Une fois ce modèle d'hyperconsommation d'alcool validé, il sera reproduit chez 70 souris afin de tester l'effet de l'apomorphine à l'aide d'une mini-pompe osmotique qui délivrera en continu une solution physiologique à 1 groupe de 10 souris ou de l'apomorphine à 50 souris (5 doses d'apomorphine, 10 souris par groupe). La consommation d'alcool sera mesurée quotidiennement afin d'évaluer l'effet de l'apomorphine. A la fin du protocole, les souris seront sacrifiées pour prélever le cerveau et analyser l'effet de l'apomorphine sur diverses voies impliquées dans l'addiction.

Ce protocole respecte la règle des 3R. Remplacement: le recours à l'expérimentation animale est justifié par l'impossibilité de modéliser *in silico* ou reproduire *in vitro* les comportements alcooliques qui sont complexes, faisant intervenir différentes zones du cerveau mais aussi des organes périphériques comme l'intestin. Réduction: le nombre d'animaux par groupe a été calculé en tenant compte de la variabilité connue de la consommation d'alcool dans ce modèle. Raffinement: l'anxiété liée à l'isolement

en cages individuelles des souris sera minimisée par un enrichissement du milieu, la douleur lors de l'implantation chirurgicale des mini-pompes sera réduite par l'utilisation d'anesthésique et d'analgésiques en per-opératoire. Les effets non-désirables éventuels de l'apomorphine seront réduits en appliquant les points limites.

17472 La pandémie de la Covid-19 causée par le SARS-CoV-2, virus de la famille des beta-Coronaviridae, est devenue une urgence sanitaire et médicale dans la plupart des pays dans le monde, d'où la nécessité de développer de nouveaux modèles expérimentaux pertinents dans le but de tester l'efficacité de nouveaux médicaments, d'évaluer la potentialité de nouveaux candidats vaccinaux et d'étudier la physiopathologie de cette nouvelle maladie.

Ce projet s'intéresse au deuxième aspect évoqué, à savoir l'étude de l'efficacité d'un nouveau candidat vaccin contre la pathologie induite par la Covid-19.

Le choix du modèle expérimental pour cette nouvelle maladie est crucial. Il n'existe à ce jour aucun système *in vitro* permettant de reproduire l'interaction hôte-virus et de tester l'efficacité d'un candidat vaccin sur ce virus. La souris, notamment la souris transgénique exprimant le récepteur humain Ace2 qui permet l'entrée du SARS-CoV-2 dans la cellule hôte, ne semble pas être le modèle idéal pour notre étude car la pathologie induite par le virus se développe peu. Le hamster semble donc le modèle rongeur adapté. Il représente un modèle pertinent pour le suivi de la réplication virale et de la pathologie induite de type inflammatoire, paramètres centraux de notre étude de protection vaccinale.

Dans le laboratoire, au cours du développement du vaccin vivant atténué (BPZE1) contre *Bordetella pertussis* (agent étiologique de la coqueluche), 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 les infections virales ou bactériennes hétérologues. Il nous semble donc essentiel de tester la potentialité de ce vaccin sur la pathologie induite par le SARS-CoV-2 chez le hamster.

Un autre pan de recherche pourra être testé en finalité. En effet, comme BPZE1 est une bactérie vivante, nous pouvons également l'utiliser comme « plateforme d'expression » d'antigènes hétérologues. Donc différentes souches de BPZE1 exprimant un antigène du SARS-CoV-2 vont être construites et testées dans le modèle hamster. Ces souches devraient permettre aux hôtes ayant reçu ces vaccins hétérologues de développer des réponses immunitaires spécifiques et donc d'être encore mieux protégés contre le SARS-CoV-2.

La demande présente aura donc pour but dans un premier temps de vérifier que notre vaccin BPZE1 est capable de coloniser correctement le tractus respiratoire du hamster et si c'est le cas d'étudier son pouvoir protecteur contre une infection par le SARS-CoV-2. Dans un 2ème temps, si nous obtenons de bons résultats d'expression antigénique avec les souches hétérologues BPZE1-SARS-CoV-2, ces 4 souches seront également testées en colonisation chez le hamster et pour leur potentialité à protéger contre un challenge avec le coronavirus.

Nous aurons très à cœur de respecter la règle des 3R. N'ayant pas de possibilité de remplacement *in vitro*, le nombre nécessaire de hamsters par groupe sera optimisé au minimum de façon à obtenir des résultats probants et statistiquement satisfaisants. Nous utiliserons des procédures rigoureuses, avec un personnel habilité à l'expérimentation animale et vigilant sur le bien-être animal, notamment lors du développement de la Covid-19. A cette fin, 1092 hamsters seront nécessaires pour cette étude.

17473 Le syndrome de Sanfilippo est la conséquence d'une accumulation de molécules de sulfate d'héparane, partiellement dégradées, dans les tissus de l'organisme (la sulfate d'héparane est un polysaccharide présent dans les tissus animaux). Ceci est le fait d'une mutation génétique qui affecte l'activité d'une enzyme nécessaire pour la dégradation du sulfate d'héparane. Ces molécules mal dégradées, qui ne peuvent pas être éliminées, entravent le développement normal du cerveau puis détruisent les cellules du cerveau. Les premiers symptômes de la maladie associent un retard du développement cognitif associé à une hyperactivité, un comportement autistique et des troubles du sommeil. Ils apparaissent habituellement avant l'âge de 3 ans. Par la suite, l'atteinte neurologique entraîne une déficience intellectuelle et une réduction des capacités motrices qui aboutissent à la perte d'autonomie vers l'âge

de 10 ans. Il y a aussi une légère dysmorphie faciale. Actuellement, aucun traitement approuvé ne peut aboutir à la guérison. Les seuls soins apportés visent à traiter les complications liées à la maladie et améliorer la qualité de vie des malades et de leur entourage. Différentes stratégies thérapeutiques ont été testées, telles que la greffe de moelle osseuse ou encore la production d'enzyme recombinante mais leur impact sur l'évolution neurologique est faible. La thérapie génique semble être encourageante pour traiter cette pathologie. Un premier essai clinique par thérapie génique intracérébrale a donné des résultats sont très encourageants chez les patients les plus jeunes. Le traitement est bien toléré et indique un bénéfice dans le développement neurocognitif. Cependant, il est important d'augmenter la quantité d'enzyme apportée et de mieux cibler la périphérie du cerveau. Pour cela, nous proposons de changer de vecteur et d'utiliser un sérotype d'AAV passant la barrière hématoencéphalique. Nous allons donc réaliser une étude préclinique sur le modèle murin que nous avons disponible au laboratoire et que nous avons déjà utilisé lors de notre précédente étude. Nous avons déjà caractérisé ce modèle, nous pourrions donc comparer nos résultats avec les précédents. Le modèle MPSIIIB-/- est un modèle knock-out mimant bien la pathologie humaine, bien référencé dans la littérature. De nombreux laboratoires l'ont utilisé pour étudier la physiopathologie de ce syndrome ainsi que certaines options thérapeutiques. C'est pourquoi le recours à l'utilisation de souris est indispensable à notre étude. Pour l'ensemble du projet il est prévu d'utiliser au maximum cinq groupes de trente souris qui seront reproduits par trois soit 450 animaux sur 5 ans et d'appliquer la règle des 3R et selon la directive européenne 2010/63/UE comme suit :

Remplacement : Les animaux sont utilisés après des analyses réalisées *in vitro* afin de confirmer des résultats démontrés et des hypothèses formulées à partir des travaux réalisés sur cellules. A ce stade de l'expérimentation, l'utilisation de l'animal est inévitable. Actuellement aucun modèle *in vitro* ne permet de mimer le phénomène étudié dans son ensemble et dans sa complexité. Les études sont systématiquement optimisées (doses AAV, durée) d'après la littérature ou les observations réalisées au laboratoire. De plus, les traitements sont administrés de la façon la moins invasive possible (par priorité : alimentation ou boisson/injection IP/ injection IV).

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, nous utiliserons des groupes de 10 souris par expérience et nous répéterons les expériences 3 fois afin de rendre nos résultats exploitables. Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons autorisés réglementairement seront prélevés sur l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de tissus. 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*.

Raffinement : Le bien-être des animaux sera suivi tout au long de nos expériences et fera l'objet de procédures strictes. Les souris seront toujours hébergées en groupes dans des cages avec une surface réglementaire, avec un libre accès à l'eau et la nourriture. Un suivi des animaux a été mis 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 animaux sont hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et auront à disposition des igloos, des bâtons à ronger et cotons pour la nidification. Les animaux sont suivis quotidiennement, permettant la détection précoce d'anomalies éventuelles. Un animal sera euthanasié s'il présente une prostration continue, une déshydratation ou une perte de poids supérieure à 20%. Des périodes d'acclimatations à l'hébergement comme à la manipulation permettront de limiter l'angoisse des animaux. La douleur liée à l'expérimentation sera limitée par l'utilisation systématique d'analgésiques. En outre, 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.

17474 PI usieurs molécules de chimiothérapie sont disponibles pour lutter contre le mélanome métastasé. Les taux de réponses restent cependant faibles (inférieurs à 20%). Depuis 2011, les nouvelles thérapies agissant contre le mélanome métastasé telles que les immunothérapies offrent des résultats prometteurs. Cependant, malgré l'espoir suscité par ces dernières stratégies, il est vite apparu que la progression tumorale reprenait souvent 6 à 8 mois après la mise en place du traitement et les options thérapeutiques sont actuellement peu efficaces contre ces récives. Il est donc toujours urgent de

développer de nouvelles molécules et notamment sélectionner celles qui stimulent le système immunitaire afin de permettre une protection sur le long terme.

Ce projet vise à évaluer une nouvelle série de composés actifs contre les formes résistantes de mélanome métastatique. La partie de notre projet qui fait l'objet de cette saisine consiste désormais à étudier l'efficacité d'une de nos molécules dans un modèle de mélanome chez la souris immunocompétente de manière à analyser les effets antitumoraux et les mécanismes d'action impliqués dans les effets de cette molécule. L'intégralité de ce projet de recherche est conceptualisée suivant la règle des trois R : Remplacer, Réduire et Raffiner.

Remplacer : En amont de ce projet de recherche préclinique chez la souris, nous avons réalisé de nombreuses investigations démontrant les effets du JMV5038 et validant la nécessité d'aller plus loin pour proposer cette nouvelle étude. Nos résultats préliminaires apportent la preuve de concept *in vitro* de l'efficacité de notre composé principal, le JMV5038, sur plusieurs lignées de mélanome avec un double effet d'altération de la réplication de l'ADN et de libération des signaux de danger stimulant le système immunitaire. La toxicité du JMV5038 ainsi que ses concentrations efficaces ont été validées sur le modèle ex-ovo de xénogreffes sur membrane chorioallantoïdienne d'oeufs fécondés de poule (CAM). Puisque notre objectif est d'étudier la réponse immunitaire anti tumorale induite le JMV5038, il n'est plus possible à ce stade de substituer l'animal à un modèle *in vitro* qui ne peut pas retranscrire la complexité des interactions entre le système immunitaire et les cellules tumorales. Les questions posées désormais ne peuvent l'être que dans un modèle murin immunocompétent.

Réduire : Le nombre d'animaux est estimé à 338 souris sur 2 ans nous permettant d'évaluer de manière exhaustive les effets physiologiques (effets antitumoraux croissance tumorale et survie) mais aussi mécanistiques (implication du système immunitaire et composantes cellulaires et moléculaires associées). L'ensemble des approches *in vitro* et *ex vivo* réalisées nous ont permis de sélectionner un composé, le JMV5038 ainsi que ces concentrations efficaces réduisant ainsi le nombre de souris nécessaires. D'autre part le projet est dessiné dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux dans le cheminement expérimental proposé, dans la mesure où la validation d'une étape donnera le feu vert à l'étape suivante uniquement si les résultats attendus sont significatifs. Les étapes 1 et 2 seront effectuées à minima et concernent 144 animaux. Si les résultats de ces étapes ne correspondent pas aux effets attendus, le projet stoppera à ce stade. D'autre part, notre expertise du modèle et de la procédure de greffe en sous cutané de cellules tumorales pour éviter les nécroses des tumeurs, nous permet d'obtenir une homogénéité élevée de la pousse tumorale et donc de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental (compris entre 6 et 12 suivant les groupes).

Raffiner : Les animaux seront hébergés (5 par cage) en milieux enrichis, la durée d'hébergement des animaux est réduite au minimum. Le comportement des animaux sera observé quotidiennement pour détecter tout signe de stress et d'agressivité. Si nécessaire un animal agressif pourra être isolé des autres mais pour une durée maximale de 5 jours. Des souris femelles seront utilisées afin de réduire le risque d'agressivité et d'isolement. Le poids des animaux sera mesuré une fois par semaine et toute perte de poids importante (>15 à 20% du poids de l'animal) entrainera l'arrêt de l'expérimentation. Un suivi de l'apparition d'autres signes cliniques sera effectué au cours de l'expérience. Le cas échéant, ils seront reportés sur une fiche de suivi clinique, mise en place par la Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) de l'IRCM." Dans les conditions expérimentales définies, les animaux ne souffriront d'aucune difficulté à se mouvoir et à s'alimenter. Les différentes molécules seront utilisées à des concentrations n'entraînant aucun effet secondaire et seront administrées sur des durées adaptées. Cependant une surveillance particulière journalière sera apportée aux animaux pour détecter précocement tout signe de souffrance ou d'angoisse. Même si l'ensemble de nos procédures sur lesquelles nous avons du recul ne devrait pas le nécessiter, l'utilisation d'analgésiques ou d'anti-inflammatoires pourra être utilisée comme détaillé dans les procédures. Au cours de nos expériences antérieures, nous n'avons jamais observé de signe de prostration, de diarrhée ou de déshydratation induite par les greffes sous cutané de cellules de mélanome. Notre pratique vise à réduire le plus possible les contacts avec les animaux pour limiter les contentions et le stress qui y est associé. Perte de poids, diarrhée, prostration, difficulté respiratoire, agressivité et isolement sont tous des critères d'arrêt conduisant au sacrifice des animaux avant la fin du protocole.

17475 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 ou une inhibition 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 158 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...)

17476 Le diabète de type 2 est considéré comme une véritable épidémie qui affecte près de 400 millions de personnes dans le monde. Cette pathologie est devenue un facteur de morbi-mortalité majeur favorisé par le développement de l'obésité, du fait notamment d'une modification des habitudes alimentaires (alimentation hypercalorique) et d'un mode de vie plus sédentaire, en particulier dans les pays émergents. Actuellement, différentes approches thérapeutiques sont disponibles pour traiter le diabète de type 2, d'abord en monothérapie, puis par des associations de médicaments ayant des mécanismes d'action différents. Toutefois chacun des produits est susceptible d'induire des effets indésirables survenant à plus ou moins long terme. Il est donc important, dans ce contexte concurrentiel, de développer des nouveaux traitements entraînant le moins possible d'effets indésirables, notamment grâce à des molécules d'origine naturelle telles que les polyphénols alimentaires ou leurs métabolites circulants.

Des études préliminaires réalisées grâce à des méthodes alternatives (lignées cellulaires) nous ont permis de sélectionner des molécules d'origine naturelle (polyphénols ou métabolites de polyphénols) au potentiel antidiabétique.

L'utilisation d'un modèle animal reste néanmoins le seul moyen aujourd'hui pour évaluer l'effet antidiabétique de molécules particulièrement prometteuses *in vitro*.

Nous travaillons dans le souci du respect de la règle des 3 R. Une attention particulière est portée afin de réduire le nombre d'animaux utilisés (seules les molécules ayant montré une activité particulièrement prometteuses *in vitro* seront testées *in vivo*), de raffiner l'environnement

(enrichissement dans les cages, réduction au minimum de l'angoisse et de la douleur) et de remplacer les animaux par l'utilisation de méthodes alternatives (étude *in vitro* sur lignées cellulaires β INS-1).

Notre objectif sera donc d'étudier, chez des rats diabétiques GK, l'activité antidiabétique de ces nouvelles molécules. Celles-ci seront administrées pendant 3 semaines et seront testées seules ou en association avec un médicament antidiabétique de référence utilisé en thérapeutique.

Ce projet impliquera l'utilisation de 240 rats Wistar, 60 rats Wistar Kyoto et 310 rats GK soit 610 rats au total sur une durée de 5 ans.

17477 Ce projet, s'inscrit en continuité du projet intitulé « Etude de l'immunogénicité d'anticorps thérapeutiques aérosolisés dans un modèle murin d'infection pulmonaire bactérienne chez la souris mâle » dans lequel nous caractériserons les réponses immunitaires adaptatives de l'hôte lors de l'administration d'anticorps monoclonaux (Ac) par voie pulmonaire, dans le cadre d'infections respiratoires ou de tumeurs pulmonaires.

Dans le contexte de lutte contre certaines pathologies respiratoires (PR), cette immunogénicité peut avoir l'avantage d'induire une réponse humorale spécifique contre l'agent pathogène ou la cellule cancéreuse. Elle permet une protection à long terme quand le pathogène ou les cellules cancéreuses sont réinjectées. Des données préliminaires générées au laboratoire montrent que les Ac administrés par voie pulmonaire induisent une réponse thérapeutique contre les PR, supérieure à celle obtenue après une administration systémique ainsi qu'une réponse humorale spécifique. Ce projet vise à établir une preuve de concept de l'effet vaccinal des anticorps administrés par voie pulmonaire et à caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cet effet, dans deux contextes pathologiques différents (infectieux et tumoral).

L'étude de la réponse immunitaire, induite par un anticorps thérapeutique administré par les voies aériennes, sera réalisée dans un modèle infectieux. Dans un second temps, nous élargirons ces résultats à un modèle animal représentatif de tumeurs pulmonaires chez l'Homme. Dans le cadre de ce projet, nous nous attacherons à comparer l'administration des anticorps par voie pulmonaire à la voie intraveineuse (i.v). Nous pourrions ainsi évaluer la supériorité de la voie pulmonaire dans la mise en place d'un effet de type vaccinal, par les Ac, et dans la lutte contre les PRs. Le projet fait intervenir 4 procédures et un total de 4855 animaux sur 5 ans.

Afin de respecter la Règle des 3R :

Raffiner : les souris seront élevées en communauté dans des cages comprenant des éléments d'enrichissement (papier absorbant et des fragments de boîtes à œuf). L'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter la souffrance des animaux (anesthésie, point limite).

Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse thérapeutique et immunitaire d'un organisme entier, face à une tumeur ou une bactérie administrée par la voie pulmonaire et sont insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins d'infection à PsA ou de tumeurs pulmonaires (B16-F10) sont très bien décrits dans la littérature et permettent de mimer les phénomènes observés chez l'Homme. Les outils transgéniques, permettant une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires mis en jeu dans l'effet vaccinal induit par les Ac, sont disponibles chez la souris.

Réduire : Les modèles murins d'infection à PsA ou de tumeurs pulmonaires B16-F10 sont maîtrisés 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 le modèle le plus adapté pour ces études précliniques car nous pouvons étudier la mécanistique de l'effet vaccinal induit par les Ac délivrés par voie pulmonaire en comparant des souris WT et des souris transgéniques pour les cibles immunitaires mises en jeu dans l'effet recherché (Figure 1).

17478 Les mammifères possèdent un déterminisme du sexe XX/XY extrêmement conservé, pourtant quelques rares espèces échappent à la règle. Récemment nous avons décrit un nouveau déterminisme du sexe chez une espèce proche de la souris domestique, la souris naine africaine *Mus minutoides*. Chez cette espèce, il existe en effet une très forte proportion de femelles XY (et non XX).

Ce projet est axé sur la compréhension de ce système atypique à travers deux approches, l'une de biologie évolutive, l'autre de biologie fonctionnelle.

(i) L'approche évolutive consiste à comprendre comment un tel système a pu évoluer. En effet, il s'agit d'un véritable paradoxe darwinien puisque ce système est associé à un très fort coût reproductif (perturbation de la gamétogénèse et production d'embryons non viables YY). Il existe donc des mécanismes évolutifs favorisant sa diffusion que nous recherchons.

Nous avons déjà montré que cette inversion sexuelle était due à un chromosome X mutant féminisant que nous avons appelé X*. Dans cette espèce il y a donc trois chromosomes sexuels qui ségrègent, X, Y et X* qui donnent des mâles XY et des femelles XX, XX* et X*Y. Outre l'inversion sexuelle, ce troisième chromosome sexuel entraîne un cortège de différences phénotypiques: comparée aux femelles XX et XX*, les femelles X*Y ont étrangement un meilleur succès reproductif (première portée plus précoce, taille de portée plus grande, taux d'ovulation plus important, plus de descendants en moyenne au cours de la vie), elles sont également plus agressives, moins anxieuses, ont des comportements masculinisés, etc.... Au cours de ce projet nous allons poursuivre le phénotypage de ces femelles en réalisant de nouveaux tests comportementaux (et notamment soins maternels, exploration du milieu). En parallèle nous allons nous intéresser plus particulièrement au cerveau de ces femelles X*Y et tester si celui-ci est masculinisé comme le suggèrent les études comportementales (transcriptomique et neuro-biologie).

(ii) L'approche fonctionnelle consiste à identifier le(s) gène(s) responsable(s) de l'inversion du sexe chez une espèce non-modèle, ce qui permettrait de mieux comprendre les bases génétiques du déterminisme du sexe chez les mammifères en général, et de déterminer des gènes candidats aux inversions de sexe pathologiques chez l'homme en particulier.

Dans ce contexte, nous réaliserons des analyses de transcriptomique et d'immuno-histochimie afin de déterminer les profils d'expression de gènes candidats à l'inversion de sexe.

Ce projet a pour vocation première de faire de la reproduction (nous avons en permanence une quarantaine de couples reproducteurs), du phénotypage comportemental et de l'euthanasie pour prélèvement d'organes, sans procédure entraînant de la souffrance. La seule véritable procédure expérimentale à proprement parlé concerne le caryotypage (une dizaine d'individus par an maximum, soit 50 animaux pour la durée du projet), il s'agit d'un protocole avec un degré de gravité nul, il n'y a pas de points limites à renseigner spécifiquement. Très soucieux du bien-être animal, je respecte la règle des 3R (en Réduisant au maximum le nombre d'individus par expérience, en Rafinant autant que possible la méthodologie en faisant une veille de la littérature sur le sujet, en remplaçant ce modèle biologique unique). Si nous voyons une souris agressée par ses congénères, elle est automatiquement isolée ou sacrifiée (en fonction de la gravité des blessures). Les cages sont spacieuses (terrariums en plexiglas 38x26x24cm pour un couple), fortement enrichies (sciure; plusieurs logis, rouleaux en cartons, matières diverses pour faire des nids, nourriture variée: graines de millet, sorgho, nourriture "bouchons" pour souris, complémentés par des crevettes séchées, vers de farine déshydratés et vivants, etc).

17479 Le cerveau se définit comme le centre intégrateur d'un système de communication basé sur la réception d'informations sensorielles et l'activation motrice de nos muscles. La compréhension de l'organisation du cerveau, de son fonctionnement et de sa capacité d'adaptation sont des challenges majeurs de la recherche biomédicale. En effet, des enjeux sociétaux forts nous incitent à acquérir de nouvelles connaissances dans la compréhension des phénomènes adaptatifs de notre cerveau en réponse à des modifications de nos expériences sensorielles et motrices d'origine physiologique (activité physique, sédentarité, vieillissement...), pathologique (maladies neurodégénératives...) ou traumatique (plâtre, amputation, lésions cérébrales...). Ces phénomènes adaptatifs portent le nom de plasticité neuromusculaire.

Dans le cadre de ce projet, notre intérêt se porte sur l'étude des mécanismes moléculaires de cette plasticité cérébrale et sur ses répercussions fonctionnelles lors d'une hypoactivité chez le rat. Plus particulièrement, nos travaux concernent la O-N-acétylglucosaminylation (ou O-GlcNAcylation), un phénomène moléculaire qui consiste en la modification de l'activité d'une protéine due à l'ajout d'une

molécule de sucre. Certaines données suggèrent que la O-GlcNAcylation pourrait jouer un rôle crucial dans les mécanismes moléculaires à l'origine de la plasticité neuromusculaire. Ce projet aura pour but d'analyser les effets d'une modulation des taux de O-GlcNAcylation dans le cortex cérébral sur la plasticité neuromusculaire de rats soumis à une hypoactivité. La plasticité neuromusculaire sera évaluée à tous les niveaux de la voie sensorimotrice : cortex cérébral (cartes somatotopiques corticales et motrices), moelle épinière (réflexe de Hoffmann), muscle (activité électromyographique) et au niveau fonctionnelle (comportement moteur). Cette étude fondamentale a pour but final d'apporter de nouvelles connaissances afin d'aider à prévenir chez l'Homme d'une part les effets délétères de l'hypoactivité ou de maladies neurodégénératives sur le système nerveux, et d'autre part les perturbations qui en découlent, telles que les chutes, et leurs conséquences : pertes d'autonomie, altération de la qualité de la vie, augmentation de la morbidité et de la mortalité.

Pour ce projet, le nombre maximal d'animaux par groupe est estimé à 10 rats. Compte tenu du nombre d'études (6) et du nombre de groupes (6), l'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ces études requiert un nombre total estimé à 260 rats. Afin de répondre aux exigences de la règle des 3R, nous veillerons aux éléments suivants :

REDUCTION : 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).

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. 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 encours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

REMPACEMENT : Il s'agit d'un projet portant sur les effets de l'inactivité physique sur le fonctionnement du système nerveux central. Un tel projet de neurosciences intégratives ne peut être mené avec des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico*.

17480 Les mélanomes sont des tumeurs malignes qui ne représentent qu'un faible nombre des cancers cutanés mais qui sont responsables de 80% des décès liés à des tumeurs de la peau, ce qui en fait un problème de santé publique majeur. L'incidence globale des mélanomes ne cesse d'augmenter avec 1 personne sur 50 qui sera diagnostiquée avec un mélanome durant sa vie. Par ailleurs, quand la maladie métastase et touche d'autres organes, la mortalité associée reste extrêmement forte, avec une survie à 5 ans de l'ordre de 16%. Le développement de nouvelles thérapies est associé, en grande partie, à une meilleure connaissance des mécanismes qui sous-tendent la croissance des cellules de mélanomes. Ainsi, le développement de thérapies dites « ciblées » qui visent certains acteurs majeurs du développement des mélanomes comme les protéines de la famille « BRAF » ou « MAPK », représente une avancée majeure dans le traitement du mélanome métastatique. Cependant, ces thérapies ciblées ne sont efficaces initialement que chez 50% des patients (uniquement ceux qui arborent des mutations dans le gène BRAF) et leur utilisation prolongée est toujours associée à l'émergence de mécanismes de résistance et à des récurrences systématiques à moyen terme. Ces données cliniques illustrent bien la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour une meilleure prise en charge du mélanome. Le succès de ces nouvelles thérapies dépend, en partie, de la disponibilité de modèles animaux précliniques permettant d'évaluer leur efficacité avant l'administration chez l'homme. Ces modèles s'avèrent également important pour la compréhension des mécanismes à l'origine du développement des mélanomes et ceux associés à la résistance aux traitements. Le modèle de xénogreffe dérivée du patient (aussi appelé PDX) est un modèle approprié pour répondre à ces questions. Ces PDX sont couramment utilisées pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, pour l'évaluation préclinique de l'efficacité de nouveaux médicaments, et pour l'identification de biomarqueurs. Nous souhaitons développer et amplifier 10 modèles PDXs de mélanomes métastatiques, ce qui correspond à un nombre total de 300 souris. De plus, nous prévoyons de développer des modèles de résistance aux thérapies ciblées à partir de 5 de

ces 10 modèles (pour un total de 200 souris) pour pouvoir étudier les mécanismes qui sous-tendent l'émergence de récurrences. Au total, ce projet nécessitera donc 500 souris sur 5 ans.

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 mise en place et l'amplification de 10 modèles murins issus de tumeurs de patients atteints de mélanome métastatique. Dans l'avenir, ces modèles PDXs seront également mis à la disposition de la communauté scientifique pour d'autres types d'études, ce qui résultera en une réduction non négligeable du nombre d'animaux utilisés.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique les notions d'élevage en milieu enrichi et de points limites (critères d'interruption). Afin d'améliorer la vie des souris, elles seront maintenues dans des cages d'une superficie de 500cm². La litière sera enrichie avec des briques de peuplier ou des carrés de cellulose. Nous porterons une attention particulière au bien-être de nos animaux avec un suivi quotidien des animaux.

- « Remplacer » les modèles animaux : au sein de ce projet, l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales est indispensable. Il n'existe en effet pas d'alternative *in vitro* permettant de faire croître une tumeur isolée à partir d'un patient tout en maintenant la diversité des cellules qui composent cette tumeur.

17481 Dans le but d'assurer une traçabilité et une optimisation de l'apprentissage des gestes techniques réalisés en expérimentations sur animal de laboratoire, le présent projet consiste à mettre en place et assurer des formations spécifiques aux gestes d'expérimentations les plus couramment utilisés.

L'apprentissage se fera par encadrement d'une personne compétente et formée. Nous enregistrerons les animaux destinés à ce projet de formation pour des étudiants, des ingénieurs/techniciens ou chercheur souhaitant maîtriser spécifiquement certaines techniques.

Le projet s'inscrit dans une volonté de permettre une meilleure formation et maîtrise des gestes de base en expérimentation animale, ce qui contribue fortement à l'application dans notre structure de la règle des 3Rs de façon générale.

En effet, une meilleure estimation du besoin et du nombre d'animaux (réduction), une meilleure maîtrise des gestes et prises en charge des animaux (raffinement).

De plus la mise en place de ce projet se fait lui-même en optimisant l'utilisation des animaux sur le plateau et répondre au mieux au 3R pour ce projet :

Réduction : -La réduction s'observe par une réutilisation des animaux produits n'étant pas considérés comme d'intérêt (hors projet) et n'ayant pas de phénotype dommageable.

-La formation aux gestes techniques se fera sur des souris destinées à être euthanasiées (notamment celles ne portant pas les modifications génétiques d'intérêts).

-nous utiliserons des mâles et des femelles à des âges variés.

Raffinement : -Les gestes techniques seront réalisés : injections et prélèvements par différentes voies. Les contentions seront adaptées en fonction des techniques.

-Toutes les injections se feront avec des solutions injectables sans effet (type NaCl stérile). Les volumes de prélèvements de sang seront effectués selon le poids de l'animal aux fréquences respectant sa physiologie.

-Nous mettrons en place une anesthésie gazeuse quand cela est recommandé pour certaines techniques engendrant une douleur chez l'animal.

-Le suivi du bien-être animal sera effectué quotidiennement par un personnel compétent. Les animaux sont pris en charge dès leur entrée dans le service par la Structure du Bien-Etre Animal et au quotidien pour identifier tout signe clinique telle que la prostration, l'agressivité ou la douleur. Nous utiliserons, pour cela une grille d'évaluation de la douleur avec application de points limite.

Remplacement : -Le remplacement ne peut pas s'effectuer car il est nécessaire de pouvoir s'entraîner sur ces animaux avant de réaliser le projet *in vivo* souhaité

Ce projet va nécessiter sur 5 ans, la réutilisation de 1 800 animaux (soit 200 animaux par geste technique).

17482 Depuis la fin de l'année 2019 et son émergence dans la province de Wuhan en Chine, la pandémie de COVID-19 causée par le coronavirus SARS-CoV-2 sévit, avec à ce jour, plus de 46 millions de cas détectés et plus d'un million de décès survenus dans le monde d'après l'OMS.

Les coronavirus provoquent habituellement des infections hivernales bénignes telles que des rhumes. Toutefois, au cours des 20 dernières années, deux syndromes d'infections respiratoires aiguës sévères ont été causés par des coronavirus : le SARS (« severe acute respiratory syndrome ») en 2003 et le MERS (« Middle East respiratory syndrome ») en 2012.

Les signes cliniques de l'infection par le virus SARS-CoV-2 sont notamment de la fièvre et de la toux. L'infection peut se compliquer de difficultés respiratoires, d'une détresse respiratoire aiguë sévère (DRAS) et d'une défaillance multiviscérale. Ce spectre étendu des symptômes observés rend délicate la prise en charge des patients. Différents troubles neurologiques, ophtalmologiques ou encore dermatologiques peuvent en effet également être associés à la COVID-19. Ces complications semblent toucher préférentiellement les personnes âgées, fragiles ou atteintes de maladies chroniques telles que le diabète et l'hypertension.

Actuellement, la communauté internationale ne dispose pas de traitement efficace contre ce virus pour contenir l'épidémie. Il est donc primordial de mettre en place rapidement des programmes de recherche pour disposer de moyens et de modèles expérimentaux permettant de prévenir et traiter les nouvelles infections par le SARS-CoV-2.

Depuis le début de l'année 2020, différents projets nationaux et internationaux ont été lancés et nous participons à plusieurs d'entre eux.

Le but de ce projet est d'évaluer, chez le modèle primate non-humain, la vitesse de biodistribution du virus SARS-CoV-2 à l'échelle de l'organisme entier et également plus précisément au niveau du tractus respiratoire inférieur par imagerie médicale afin de pouvoir répondre aux questions de localisation et de persistance du virus dans l'organisme. Il est aujourd'hui impossible de reproduire *in vitro* la complexité d'une infection virale et d'une réponse immunitaire. Le recours à un modèle animal est donc nécessaire pour apporter les informations nécessaires permettant in fine de mieux orienter les traitements symptomatiques chez les patients. Le primate non-humain, par sa proximité génétique et anatomique avec l'être humain, est le modèle d'étude le plus pertinent. De plus, l'infection du macaque par le SARS-CoV-2 reproduit effectivement la majorité des cas observés chez l'humain.

Les étapes de ce projet sont donc :

- D'évaluer différents candidats traceurs pour visualiser le virus chez l'animal par imagerie médicale
- d'évaluer localement certaines réponses immunitaires locales par imagerie médicale

Le projet prévoit de tester au maximum 5 candidats traceurs et trois voies d'exposition au virus. Pour cela, il est prévu d'utiliser au maximum 42 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu sur une durée de 3 ans (soit en moyenne 14 animaux/an). Ce nombre prend en compte les différents scénarios du projet. Il est donc attendu que, potentiellement, moins d'animaux soient utilisés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. Les méthodes expérimentales 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 virus et pose de puces électroniques de suivi de la température). Les critères d'arrêt sont prévus dans le projet en cas de progression de la maladie ou d'éventuels effets inattendus du vaccin et des molécules thérapeutiques. Les vétérinaires de l'installation seront alertés et mettront en œuvre des traitements en adéquation avec l'expérience. Les animaux seront hébergés en groupe lors des phases d'immunisation et en individuel dans des modules contigus permettant des interactions sociales lors de la phase d'infection aiguë (durée attendue d'une quinzaine de jours). Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie et qui sera renforcé lors des phases d'hébergement individuel.

17483 La maladie de Pompe est une maladie lysosomale génétique fatale due à une anomalie de fonctionnement d'une enzyme lysosomiale qui hydrolyse le glycogène en glucose. Cette maladie se manifeste par une faiblesse musculaire progressive (myopathie) et des difficultés respiratoires en fonction de l'âge d'apparition de la maladie. Ainsi, chez les enfants atteints de la forme infantile, le muscle du cœur est gravement touché entraînant des troubles cardiaques sévères. En l'absence de traitement, ces enfants meurent dans les deux premières années de vie à cause d'une insuffisance cardio-respiratoire.

Malgré le développement au cours des dernières décennies de biothérapies comme les enzymes recombinantes humaines, la maladie de Pompe souffre d'une absence de prise en charge thérapeutique importante. En effet, l'efficacité thérapeutique de ces macromolécules dépend fortement de leur capacité à accéder aux organes et/ou cellules cibles. Or, du fait de leur poids moléculaire très élevé, ces molécules ont une faible distribution tissulaire notamment dans des organes possédant une barrière physiologique étanche avec le sang comme le cerveau. Cela a pour conséquence une absence totale ou partielle de ces enzymes dans certains organes et limite fortement l'efficacité du traitement à long terme. Afin de surmonter ces limites, nous avons développé de nouvelles méthodes de vectorisation permettant d'augmenter la distribution tissulaire des protéines recombinantes humaines. Ainsi, en les couplant à un système de transport spécifique au niveau des barrières physiologiques, nous avons réussi à les faire rentrer dans des organes jusqu'à maintenant inaccessibles ou difficilement accessibles. Cependant, ce système de transport fonctionnant parfaitement chez la souris n'est pas translatable à l'homme à cause d'une différence d'espèce importante.

L'objectif de ce projet est donc de mettre en œuvre un modèle double transgénique de la maladie de Pompe portant le système de transport spécifique humain. Ce dernier permettra d'évaluer l'effet de molécules biothérapeutiques humaines afin de sélectionner les meilleurs candidats pour des études de sécurité préclinique et éventuellement pour des études cliniques chez des patients atteints de la maladie de forme infantile. Ce nouveau modèle est obtenu par croisement de deux lignées de souris transgéniques, l'une est le modèle transgénique murin de la maladie de Pompe et l'autre possédant le système de transport humain pour faciliter la distribution tissulaire spécifique des biothérapeutiques humains.

Ces deux modèles simples transgéniques sont déjà bien caractérisés. Afin de caractériser la lignée double transgénique, nous ferons des tests comportementaux à différents âges et des mesures de paramètres biochimiques et histologiques chez les mêmes animaux. Comme le modèle simple transgénique de la maladie de Pompe présente un phénotype dommageable, un suivi clinique spécifique sera mis en place pour le modèle double-transgénique tout au long de l'étude.

Aujourd'hui, bien que des modèles *in vitro* (modèles cellulaires, organotypiques ou biophysiques) permettent de présélectionner les meilleurs candidats médicament, ils ne reproduisent que certaines caractéristiques de la maladie humaine et ne permettent pas de prendre en compte la complexité et l'interaction de l'intégralité des systèmes biologiques, en particulier la coexistence de plusieurs barrières physiologiques et les différentes voies de métabolisme. L'évaluation complète de l'effet thérapeutique des nouvelles molécules vectorisées ne peut être faite qu'avec des modèles *in vivo*. Les études dans le modèle double-transgénique de la maladie permettent donc de s'assurer que les effets thérapeutiques de nouvelles biothérapies sont évalués dans un organisme entier et complexe, possédant ainsi de façon intégrée tous les paramètres comportementaux, biochimiques et pathophysiologiques de la maladie humaine. Jusqu'à présent, il n'y a pas de méthode alternative à l'utilisation de l'animal pour évaluer les aspects mentionnés.

Les gestes d'administration et de prélèvements peuvent provoquer un inconfort léger et de courte durée. Les tests comportementaux peuvent aussi générer un léger stress ou inconfort due à la nouveauté et/ou la manipulation. Des phases de handling, d'habituation à l'environnement et à l'appareillage, ainsi qu'un nombre limité de tests à passer, sont mis en place pour diminuer l'inconfort sans remettre en cause les résultats du projet. Pour les animaux transgéniques des points limites en plus sont identifiés afin de limiter l'inconfort ou le stress liés au modèle pathologique.

A la demande du scientifique, un support du service biostatistiques sera apporté aux expérimentateurs pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études ainsi que le design à utiliser en fonction de l'objectif et des contraintes de l'étude (nombre de groupes, type de comparaisons, présence de

répétitions), de la variabilité des paramètres mesurés, de la taille des effets à mettre en évidence et de l'historique des données.

Le nombre maximal d'animaux utilisés dans ce projet sera de 85 souris sur une période de 2 ans.

17484 L'embolisation artérielle est une technique de radiologie interventionnelle qui permet l'occlusion d'un vaisseau de façon rapide, efficace et sûre. Cette technique remplace aujourd'hui la chirurgie dans un grand nombre d'indications : hémorragie de l'accouchement, hémorragie interne des accidentés de la route, malformations artério-veineuses, embolisation pour traitement oncologique...

Parmi l'arsenal thérapeutique des radiologues, les agents d'embolisation présentent des caractéristiques différentes quant à leur visibilité sous les rayons X, leur toxicité sur l'organisme, leur effet sur la paroi des vaisseaux et leur profondeur de pénétration dans les vaisseaux fins et distaux. Les dispositifs médicaux implantables par voie endovasculaire font l'objet d'un fort développement et de recherches poussées, ce qui amène très régulièrement des innovations dans ce domaine. Il est indispensable de pouvoir tester la faisabilité et l'efficacité de ces agents innovants à court et moyen termes.

Le but de ce projet est d'évaluer, sur modèle porcin, de nouveaux agents d'embolisation. Cette évaluation se fera sur la faisabilité et l'efficacité en termes d'occlusion vasculaire, mais également sur la stabilité de l'agent dans le temps et sur les effets tissulaires associés. Tous ces paramètres seront comparés à l'embolisation par des agents d'embolisation connus et commercialisés. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale, par des radiologues interventionnels et identiques à celles réalisées en pratique clinique courante chez l'Homme. Pour chaque étude de validation d'un agent innovant, 10 porcs pietrains (6mois, 40 +/-5 kg) seront inclus, répartis en deux groupes : un groupe contrôle (n=5 porcs) et un groupe d'intérêt (n=5 porcs). Ce modèle a été choisi pour ses nombreuses similarités physiologiques et anatomiques avec l'Homme. Le modèle porcin présente également l'avantage de pouvoir utiliser du matériel et des équipements identiques à ceux dédiés à l'Homme.

L'ensemble des analyses *in vivo* seront effectuées par imagerie médicale: scanners et artériographies, réalisés à l'état basal (avant l'embolisation) puis juste après, 7 jours, 1 mois et 3 mois post-embolisation. A la fin des 3 mois de suivi, tous les animaux seront mis à mort afin d'effectuer des analyses histologiques sur les vaisseaux et tissus embolisés.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle des 3R:

Remplacement: Ces dispositifs médicaux implantables vont modifier le flux sanguin, jusqu'à obtention d'une occlusion vasculaire. Il est donc très difficile, voir impossible, de simuler ces actes avec précision. Cette phase de validation préclinique sera réalisée après toutes les validation *in vitro* et *ex-vivo* nécessaires et représentera la phase de validation terminale avant le passage à l'Homme.

Réduction. Nous estimons notre besoin maximal en animaux à 10 par étude: 5 animaux contrôles (embolisés par des agents validés, connus et utilisés en pratique clinique courante) et 5 animaux d'intérêt embolisés avec l'agent innovant à valider. Le nombre d'agents d'embolisation innovants à tester est estimé à 8 sur les 5 ans, soit un total de 80 animaux maximum sur 5 ans. Ce nombre a été déterminé par l'expérience de l'équipe comme étant le nombre minimal permettant d'obtenir des effets interprétables, les données étant en très grande majorité des données qualitatives, dépendantes de l'expertise du radiologue. Pour chaque étude, les animaux du groupe contrôle seront embolisés par un agent validé et utilisé en clinique qui sera comparable à l'agent testé en terme d'indication. Si deux agents à tester possèdent les mêmes propriétés et sont développés pour les mêmes indications, les groupes contrôles ne seront faits qu'une fois afin de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-etre, les porcs bénéficieront d'une période d'acclimatation de 7 jours avant toute manipulation, auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront stabulés en groupe de 2 à 8 pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress dans un box de 9m² avec enrichissement (cordes pendantes, chaines, jouets et balles anti-morsure, fibres de bois au sol). Chaque procédure sera réalisée sous anesthésie générale, la gestion de la douleur est assurée par l'administration de morphiniques en per-opératoire. Un contrôle biquotidien pendant 1 semaine postopératoire est assuré

par une personne compétente avec évaluation du bien-être et de la douleur (par grille de score). L'évolution du score permet de noter l'amélioration ou l'aggravation de l'état de l'animal et de prendre des mesures appropriées (points limites). Le contrôle quotidien des animaux sera réalisé tout au long du projet.

17485 Les maladies de surcharge lysosomale (MSL) constituent un groupe hétérogène d'environ 70 maladies caractérisées par un dysfonctionnement du lysosome. Ces maladies sont individuellement rares mais touchent globalement plus d'un cas pour 4000 naissances. La maladie de Sanfilippo (MPSIIIB), une maladie des MSL, est caractérisée par une accumulation des Oligosaccharides d'Héparane Sulfate (HSO) dans les tissus y compris dans le système nerveux central (SNC). Cette accumulation progressive induit une série de conséquences pathologiques incluant une neurodégénérescence, une neuro-inflammation et un stress oxydant. La neuro-inflammation et le stress oxydant très précoce sont en grande partie à l'origine des premiers symptômes de la pathologie.

Il a été montré, dans des modèles murins de MPSIII, que l'utilisation d'anti-inflammatoires tels que l'aspirine ou la prednisolone permettait de réduire la neuro-inflammation, améliorer les symptômes et entraîner une normalisation de certains marqueurs de la neuropathologie. Les limites de l'utilisation de ce type de molécules sont en grande partie dues à des doses d'efficacité excessives et à un mauvais passage de la barrière hématoencéphalique (BHE). Par conséquent, il est important de développer de nouvelles approches thérapeutiques anti-inflammatoires.

De ce fait, notre objectif est d'étudier l'efficacité thérapeutique d'une macromolécule de synthèse ciblant spécifiquement la microglie sur laquelle elle est en capacité de reprogrammer un phénotype anti-inflammatoire. Nous proposons dans ce projet de tester l'activité anti-inflammatoire et antioxydante de cette macromolécule sur le modèle murin MPSIIIB. Afin d'optimiser la macromolécule spécifique, il convient d'évaluer sa dose optimale d'utilisation, sa fréquence d'administration et l'âge.

Le modèle MPSIIIB-/- est un modèle knock-out mimant bien la pathologie humaine, bien référencé dans la littérature. De nombreux laboratoires l'ont utilisé pour étudier la physiopathologie de ce syndrome ainsi que certaines options thérapeutiques. C'est pourquoi le recours à l'utilisation de souris est indispensable à notre étude. Pour l'ensemble du projet il est prévu d'utiliser au maximum 440 animaux en deux phases sur 5 ans. Une première phase de détermination Dose/fréquence de la molécule soit 80 souris et une phase d'évaluation thérapeutique de 360 souris et tout ceci en appliquant la règle des 3R et selon la directive européenne 2010/63/UE comme suit :

Remplacement : Les animaux sont utilisés après des analyses réalisées *in vitro* afin de confirmer des résultats démontrés et des hypothèses formulées à partir des travaux réalisés sur cellules. A ce stade de l'expérimentation, l'utilisation de l'animal est inévitable. Actuellement aucun modèle *in vitro* ne permet de mimer le phénomène étudié dans son ensemble et dans sa complexité. Les études sont systématiquement optimisées (doses inhibiteurs, durée du régime) d'après la littérature ou les observations réalisées au laboratoire. De plus, les traitements sont administrés de la façon la moins invasive possible (par priorité : alimentation ou boisson/injection IP/ injection IV).

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, nous utiliserons des groupes de 10 souris par expérience et nous répéterons les expériences 3 fois afin de rendre nos résultats exploitables. Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons autorisés réglementairement seront prélevés sur l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de tissus. 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*.

Raffinement : Le bien-être des animaux sera suivi tout au long de nos expériences et fera l'objet de procédures strictes. Les souris seront toujours hébergées en groupes dans des cages avec une surface réglementaire, avec un libre accès à l'eau et la nourriture. Un suivi des animaux a été mis 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 animaux sont hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et auront à disposition des igloos, des bâtons à ronger et cotons pour la nidification. Les animaux sont suivis quotidiennement, permettant la détection précoce d'anomalies

éventuelles. Un animal sera euthanasié s'il présente une prostration continue, une déshydratation ou une perte de poids supérieure à 20%. Des périodes d'acclimatations à l'hébergement comme à la manipulation permettront de limiter l'angoisse des animaux. La douleur liée à l'expérimentation sera limitée par l'utilisation systématique d'analgésiques. En outre, 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.

17486 Les cellules B jouent un rôle essentiel dans l'immunité adaptative humorale par la sécrétion d'immunoglobulines (Ig), également appelées anticorps. Lors de l'activation des cellules B par un antigène, celles-ci augmentent leur affinité pour cet antigène (bactérie, virus, parasite, etc.) en hypermutant leurs gènes d'immunoglobulines. Par la suite, ces cellules subissent une expansion clonale et une différenciation supplémentaire (soit en cellules mémoire B, soit en cellules plasmocytaires). Ce dernier stade se caractérise par sa capacité à sécréter de très grandes quantités d'Ig.

Actuellement, l'immunothérapie avec des anticorps monoclonaux est réalisée par leur injection directe chez les patients. La contrainte majeure de cette approche réside dans la courte demi-vie des anticorps, qui n'est que de 21 jours au maximum. Être capable de produire ces anticorps en continu, sur le long terme et *in vivo* est un défi majeur. Nous cherchons à utiliser la capacité de production d'anticorps à grande échelle des plasmocytes en les forçant à sécréter un anticorps thérapeutique donné. À cette fin, nous utilisons la technique d'édition du génome CRISPR pour introduire un gène codant pour un anticorps thérapeutique de manière spécifique. Notre objectif final est donc de mettre en place un processus de thérapie cellulaire basé sur la modification génétique de cellules B ayant la capacité de s'auto-greffer, de survivre et de produire à long terme des anticorps spécifiques. Ainsi, les maladies chroniques nécessitant un traitement à vie bénéficieraient d'une réponse immunitaire spécifique optimale et stable.

Avant de pouvoir imaginer de tels essais cliniques chez l'homme, il importe d'en valider les modalités dans un modèle pré-clinique. Le plus réaliste est la souris puisque ces animaux sont simples à élever, que nous maîtrisons l'expérimentation chez eux, et qu'ils ont une capacité démontrée à permettre la survie de cellules immunitaires d'origine humaine, pouvant ainsi être suivies chez l'animal vivant.

Nous étudierons donc dans ce projet la capacité de survie des cellules B primaires humaines et leur capacité à sécréter des anticorps dans un modèle où ces cellules sont administrées à des souris immunodéficientes.

Les procédures décrites prévoient l'utilisation de 30 lots de 24 souris (soit un total de 720 animaux) souris, en adéquation avec la règle des 3R :

- le Remplacement: dans ce projet, un long travail de modélisation *in vitro* a déjà été validé puisque nous cherchons à déterminer la capacité de survie des cellules B après modification génétique *in vitro* ainsi que leur capacité de produire à long terme des anticorps anti-cancéreux. Ce projet visant à la thérapie, l'efficacité finale de la stratégie ne peut être jugée que sur un organisme entier, qu'il s'agisse d'un animal sain ou affecté par une tumeur dont le traitement pourra alors inhiber la croissance. Le recours à des animaux est donc indispensable pour cette étude.

- la Réduction: afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires, les expérimentations ont été conçues de façon à utiliser le moins de souris possible tout en collectant 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 maximum de validation *in vitro* a été et continuera d'être réalisé en préalable à toute injection à l'animal. Les tailles des groupes de souris sont choisies de façon à permettre une interprétation des données statistiquement valide, à l'issue d'une expérimentation qui soit productive et ne nécessite pas de réédition.

- le Raffinement: Les animaux sont élevés dans des conditions adaptées (locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture ad libitum), avec un maximum de 5 animaux/cage (aucun animal maintenu seul dans sa cage).

Les animaux recevront une anesthésie et/ou analgésie adaptée à chaque procédure expérimentale. Les points limites sont établis de façon à détecter le plus précocement possible les signes de souffrance des animaux. Une évaluation régulière du score de grimace des animaux, de leur poids et de leur

comportement permettra d'avoir un contrôle continu sur leur état de santé. De plus, les souris seront aussi surveillées par la réalisation de technique d'imagerie *in vivo* non invasive (bioluminescence ou IRM) afin de permettre une détection précoce d'un éventuel envahissement tumoral.

17487 La maladie d'Alzheimer touche 900 000 personnes en France en 2015 et les prévisions suggèrent que 3 millions de personnes seront concernées en 2020. Aujourd'hui, il n'y a pas de traitement curatif. Des dysfonctions mitochondriales sont établies à partir de tissus postmortem qui ne peuvent en aucun cas déterminer si ces dommages sont des causes ou des conséquences de la maladie. Quand est-ce que ces dysfonctionnements apparaissent n'est pas connu. Est-ce qu'en augmentant les capacités énergétiques des mitochondries des malades, on pourrait retarder voire arrêter l'apparition de la neuropathologie n'a jamais été testé expérimentalement.

L'hétérogénéité des mitochondries entre types cellulaires et compartiments sous cellulaires impose des études anatomiquement résolutive qui captureraient la dynamique fonctionnelle des mitochondries synaptiques dans leur environnement physiologique pendant la progression de la maladie.

L'objectif du projet est de suivre les fonctions mitochondriales synaptiques pendant la progression de la maladie d'Alzheimer, et de tester l'hypothèse qu'un dysfonctionnement mitochondrial constitue une cible précoce et modifiable de la maladie.

L'étude consiste à mettre en évidence des mécanismes moléculaires entre les mitochondries et les synapses et de les exploiter pour ralentir voire empêcher la progression de la neuropathologie et des troubles cognitifs dans un modèle murin génétique de la maladie d'Alzheimer (APP/PS1).

La plupart des mécanismes et drogues agissant sur les mitochondries sont testées *in vitro* sur des cultures de neurones embryonnaires qui ne récapitulent pas la dynamique *in vivo* des mitochondries synaptiques adultes. Cela soulève des doutes quant à la précision de ces approches *in vitro* pour trouver des modulateurs des mitochondries qui soient effectifs *in vivo* chez l'adulte.

La REALISATION du projet est en 4 phases :

- 1- Validation des sondes mitochondriales fluorescentes dans le cerveau vivant par microscopie 2-photon
- 2- Mise en évidence des dysfonctions mitochondriales dans le cerveau de souris symptomatiques
- 3- Progression des dysfonctions mitochondriales et identification d'une fenêtre thérapeutique d'intervention
- 4- Efficacité des traitements candidats sur la fonction des mitochondries synaptiques et performances cognitives.

L'objet de la présente demande, qui concerne en tout 300 souris 180 CD1 et 120 APP/PS1 homozygotes mâles et femelles, de souches sauvages ou transgéniques, consiste en 3 expériences réparties en 22 groupes d'animaux sur lesquels sont pratiqués 5 procédures expérimentales complémentaires. Celles-ci sont l'induction d'une inflammation par une injection de lipopolysaccharide, l'introduction des sondes mitochondriales (electroporation ou injection stéréotaxique) et enfin 2 techniques chirurgicales (transcrânienne et craniotomie) qui permettent l'imagerie des traceurs pathologiques.

Des mesures visant à réduire, remplacer et raffiner les expérimentations ont été mises en place :

- 1) nous utiliserons une souche de souris pour laquelle la transfection des traceurs génétiques est optimale, 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 d'animaux tout en gardant la même puissance statistique.

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 prévisibles dans les modèles de pathologie, nous utiliserons un schéma thérapeutique incluant l'utilisation d'une anesthésie profonde, d'anti-inflammatoire non stéroïdien et de morphinique à faible dose.

Après la chirurgie les animaux seront maintenus en atmosphère humide et chauffée jusqu'au réveil. 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 aux procédures. Les animaux montrant d'éventuels signes d'infection seront traités avec des antibiotiques dans l'eau de boisson.

17488 Il n'existe pas actuellement de traitement curatif de la maladie d'Alzheimer (MA), maladie dont la prévalence est amenée à augmenter régulièrement au cours des prochaines décennies du fait du vieillissement de la population. L'amélioration de la connaissance de la maladie permettra d'identifier de nouvelles possibilités de traitements et 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 la présence dans le cerveau de phénomènes de dégénérescences, dû à l'accumulation de formes anormales de la protéine Tau. Une inflammation cérébrale est une composante essentielle de la MA. Elle est due à différents types de cellules immunitaires cérébrales et jouerait un rôle crucial dans la progression de la maladie dans le cerveau des patients. Lorsque cette inflammation survient autour de la naissance (période périnatale), elle pourrait favoriser l'émergence de la MA plus tard au cours de la vie. Pour répondre à cette question, nous utiliserons un modèle souris induit par des injections de molécules inflammatoires chez le souriceau qui reproduit la pathologie humaine d'une inflammation périnatale. Dans ce modèle, les animaux seront gardés en vie avant d'être transférés dans une autre structure, où ils subiront des injections cérébrales qui mimment l'accumulation de la protéine Tau (ou taupathie).

L'objectif de ce projet est de faire progresser nos connaissances dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, et en particulier dans les relations entre le processus de taupathie et la neuro-inflammation.

Les expériences seront réalisées chez 304 souris sur une période de 5 ans. La bonne reproductibilité et le faible taux de mortalité (5%) de ce modèle expérimental permettent 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. Si l'un de ces points limites est atteint, les animaux concernés seront euthanasiés selon les méthodes réglementaires.

Cette étude prendra 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 certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet. Nous aurons 8 groupes de souriceaux avec 18 animaux par groupe ; compte tenu de la mortalité, il faut 152 animaux et l'expérience sera répétée 2 fois.

Raffinement : Les injections se feront sur animaux vigiles. Les animaux seront remis dans leur nid et on vérifiera quotidiennement 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 que des points limites prédictifs à différents stades. Si l'un des 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.

17489 Notre projet de recherche translationnelle et appliquée concerne les maladies musculaires humaines d'origine génétique (myopathies congénitales). L'objectif est de valider et de caractériser un nouveau gène candidat impliqué dans une myopathie congénitale. Les résultats auront un impact direct pour le diagnostic moléculaire des patients atteints de myopathies congénitales, pour leur prise en charge, et ouvriront de nouvelles perspectives thérapeutiques. Nous avons identifié chez des patients souffrant de Myopathies Centro Nucléaire (CNM) des variations génétiques sur le gène BTBD1 et nous souhaitons poursuivre la caractérisation de ce gène sur un modèle animal.

En effet, après avoir réalisé des tests *in vitro*, sur cellules, qui nous ont permis de partiellement valider la pathogénicité des variations identifiées dans ce gène, il nous est indispensable de poursuivre la caractérisation de ces variations par un modèle murin qui nous permettra de comprendre l'impact de ces variations sur un organisme entier (REMPACEMENT).

Afin de réduire le nombre de souris nécessaire, chaque souris sera suivie et testée via plusieurs analyses, de plus, le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Ainsi nous pouvons avancer que 20 souris au maximum par groupe seront nécessaires pour conclure sur le projet (RÉDUCTION).

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, la douleur sera évaluée visuellement : capacité à se retourner, couleur de la peau, capacité à se mouvoir. À partir du sevrage, une perte de poids de 20% en une semaine conduira à la mise à mort (RAFFINEMENT).

Pour cette étude, un maximum de 223 souris seront nécessaires, 60 souris pour les expériences et 163 pour la génération de la cohorte, le maintien de la lignée et la cryo préservation.

17490 La formation initiale et continue des personnes qui interviennent en recherche animale, qu'il s'agisse des vétérinaires des soigneurs, des techniciens et des concepteurs qui utilisent des animaux à des fins scientifiques nécessite l'apprentissage de gestes techniques pour manipuler les animaux, ou pratiquer les expériences dans de bonnes conditions. Après avoir appris les bases par des méthodes alternatives comme les vidéos et les mannequins, les apprenants ont besoin de pratiquer ces gestes chez un animal vivant pour acquérir un geste efficace sans stress ni pour l'animal, ni pour l'opérateur. C'est une garantie pour une recherche scientifique de qualité, avec des résultats reproductibles et un niveau de raffinement optimal qui réduit la souffrance des animaux.

Nous organisons donc des séances de travaux pratiques pour des personnes en cours de formation initiale, formation continue, ou pour des équipes de travail en place qui ont besoin de s'améliorer. Les séances intègrent toujours une part théorique et une part de simulation sur des objets inanimés, pour mimer les gestes techniques dans un premier temps. On ne passe chez l'animal qu'après des phases d'observation ou de simulation.

Dans ce projet, nous utilisons les animaux dans des procédures peu invasives. Nous formons les personnes à la contention et la manipulation des animaux, à la réalisation de prises de sang ou à l'administration de substances. Nous pouvons aussi utiliser des animaux pour former les techniciens à l'anesthésie générale ou à la réalisation d'imagerie médicale. La technique est enseignée en l'état de l'art, et en particulier les recommandations publiées par les associations professionnelles. La formation initiale est souvent une sensibilisation ou l'on accompagne l'apprenant pour lui montrer les bonnes pratiques. Pour la formation continue, au terme de l'enseignement, la personne doit pouvoir être autonome, et appliquer la procédure telle qu'elle se réalise dans le laboratoire. Pour les administrations de substances, en général les animaux sont vigiles. Pour les prélèvements sanguins, les petits animaux comme les rongeurs sont généralement anesthésiés, les animaux plus grands comme les lapins et les chiens, sont vigiles.

Les enseignements respectent donc le principe de remplacement, puisqu'ils intègrent toujours une partie de simulation ou des démonstrations par vidéo. Ils respectent le principe de raffinement, puisqu'ils sont réalisés avec un ratio enseignant/stagiaire élevé pour s'assurer que chaque geste est bien réalisé. Les animaux sont habitués à leur environnement quelques jours avant le temps de formation. Ils sont hébergés en groupe sociaux, en fonction de leurs besoins éthologiques. Ils sont maintenus sous anesthésie pour chaque geste qui pourrait causer un stress.

Le nombre des animaux est réduit au minimum. Nous l'adaptant aux objectifs de chaque formation, de 1 à 4 stagiaires par animal, tout en évitant une sur-utilisation. Pour cela nous utilisons une fiche de suivi des animaux à chaque séance. Au total sur 5 ans, tous programmes de formation confondus, nous estimons que nous utiliserons 200 poulets, 50 porcs, 400 souris, 100 rats, 20 moutons, 50 hamsters, 50 cobayes, 50 gerbilles, 10 furets, 50 lapins et 20 chiens. La plupart des animaux proviennent de

projets de recherche où ils ont servi de témoins. Cette réutilisation permet de réduire le nombre total d'animaux mais nous ne réutilisons que des animaux qui n'ont pas subi de stress ou de douleur notables lors de la première procédure. L'avis du vétérinaire est demandé lors de la prise de décision de réutilisation.

17491 *Escherichia coli* est une bactérie qui colonise le tube digestif de l'Homme et des animaux à sang chaud, dès les premières heures qui suivent la naissance. Un sous-groupe d'*E. coli* est responsable de maladies telles que les méningites néonatales, les septicémies et les infections urinaires. Le traitement de ces infections passe par l'administration d'antibiotiques. Cependant, certaines de ces souches présentant de multiples résistances aux antibiotiques sont pathogènes pour l'homme et l'animal et présentent de plus en plus de résistances aux antibiotiques.

Les gènes responsables de ces résistances sont fréquemment retrouvés sur des plasmides. De nombreux facteurs dont l'inflammation peuvent influencer le transfert horizontal de ces plasmides au sein du tractus gastro-intestinal.

Parmi les nombreux facteurs inflammatoires, le Déoxynivalénol (DON) est une mycotoxine qui contamine les céréales et les produits dérivés des céréales en France et en Europe. La consommation de DON affecte l'intégrité de la barrière intestinale en augmentant l'inflammation au niveau de la muqueuse intestinale. Nous avons précédemment montré que le DON était capable de potentialiser le caractère pathogène de bactéries de l'espèce *Escherichia coli* (*E. coli*).

Dans ce contexte, l'objectif de cette sera de déterminer le rôle de l'inflammation induite par un contaminant alimentaire, la mycotoxine déoxynivalénol, sur le transfert de plasmides d'antibio-résistance au sein des souches de *E. coli* dans un modèle murin.

Aucune expérimentation alternative ne peut remplacer l'aspect *in vivo* de ce projet dont le but est d'étudier l'impact de souches commensales de *E. coli* sur la colonisation intestinale chez les nouveau-nés de souches pathogènes. Par ailleurs, ce modèle de transmission verticale de *E. coli* depuis la mère vers les souriceaux permet de mimer le véritable mode de transmission de la bactérie vers la descendance. Tous les moyens seront mis en oeuvre pour respecter les règles des 3R. Le projet a été élaboré de façon à réduire au maximum le nombre de souris requises. Nous travaillerons notamment avec des souris Swiss qui, au contraire d'autres lignées de souris, donnent des portées comprenant un grand nombre de souriceaux, approximativement 12 en moyenne. Ceci permettra de réduire le nombre d'animaux reproducteurs requis, et d'obtenir une descendance nombreuse afin de réaliser des analyses statistiques robustes. Le bien être de l'animal sera en permanence au centre de nos préoccupations. 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 2 fois par mois. 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'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. La procédure expérimentale, basée sur un gavage oral des souris avec une suspension bactérienne, n'implique aucune douleur. Le gavage oral des souris par des *E. coli* commensales et pathogènes n'occasionne qu'extrêmement rarement une réponse délétère pour l'animal. Tout animal présentant des signes de douleur, souffrance ou angoisse sera euthanasié.

Au total, 3402 souris (90 souris mâles, 276 femelles gestantes et environ 3312 souriceaux) seront nécessaires sur une période de 5 ans pour la réalisation de ce projet. Approximativement 3312 souriceaux pourront être analysés. Pour ce projet, il faut combiner la variable « souche bactérienne » (commensale ou pathogène) et la variable « conditions inflammatoires » (+/- déoxynivalénol ; +/- DSS).

17492 Il a récemment été montré que l'augmentation de la température d'incubation des œufs de canards mulards, donc au cours de leur développement embryonnaire, permet d'augmenter leur production de foie gras à l'âge adulte. L'optimisation de cette technique simple pourrait permettre de limiter le temps et/ou le nombre de repas de gavage ainsi que les variabilités de réponse.

Toutefois, les mécanismes impliqués restent inexpliqués et certains paramètres à améliorer. En effet, les conditions de hausse de température peuvent revêtir différentes formes (en terme de période, de durée et d'intensité). Parmi les conditions testées précédemment, deux ont été associées à une baisse d'éclosabilité (75% et 76% contre 82% chez le groupe « contrôle »).

Le premier objectif (procédure 1) de ce projet est donc d'évaluer les meilleures conditions d'incubation chez le canard mulard, permettant de maintenir voire d'améliorer la production de foie gras en réponse au gavage, tout en maintenant une éclosabilité identique au groupe contrôle. Dans cet objectif nous avons prévu de tester 8 nouvelles conditions de hausses de température d'incubation, parallèlement à une température contrôle (37,6°C). Nous souhaitons tester différentes modalités de durée (entre 10 et 14 jours de hausse de température), de période (début de la hausse de température au 9eme, 10eme, 11eme, 12eme, 13eme et 14eme jour embryonnaire) et d'intensité (hausse de 1°C ou 1,5°C, de façon continue (24h/24h) ou discontinue (16h/24h)).

Ayant à notre disposition 4 incubateurs, nous serons capables de tester en 3 expériences nos 8 conditions en maintenant à chaque fois un groupe « contrôle » avec lequel comparer nos données.

Essai n°1 :

- 1 incubateur « contrôle » (37,6°C)
- 1 incubateur pour tester une hausse de 1°C appliquée 24h/24 pendant 10 jours embryonnaires (du 11eme au 21eme jour)
- 1 incubateur pour tester une hausse de 1,5°C appliquée 16h/24 pendant 10 jours embryonnaires (du 11eme au 21eme jour)

Essai n°2

- 1 incubateur « contrôle » (37,6°C)
- 3 incubateurs tests, à adapter selon les résultats de l'essai n°1 (hygrométrie, durée, intensité, début de hausse de température...)

Essai n°3

- 1 incubateur « contrôle » (37,6°C)
- 3 incubateurs tests à adapter selon les résultats des essais n°1 et 2

Afin de conclure statistiquement sur le taux d'éclosion, nous incuberons 300 œufs dans chaque incubateur, soit $11 \times 300 = 3300$ oeufs au total.

Après éclosion les canetons seront placés dans des loges avec 0,4m² par animal (la directive 2010/63 recommandant 0,2m² par animal) durant 4 à 6 jours, afin d'être pesés et les températures corporelles relevées. A la fin de ce protocole, les animaux seront euthanasiés dans le respect des normes en vigueur ou replacés en élevage dans la mesure du possible, après que leur bonne santé soit attestée par un vétérinaire. Nous estimons le nombre total de canetons pour ce protocole à 2840.

Une fois les conditions optimales d'incubation identifiées (hausse de température n'induisant pas de baisse d'éclosabilité), le second objectif (procédure 2) sera d'évaluer la reproductibilité et l'optimisation de cette technique sur la production de foie gras.

Pour cela nous incuberons une nouvelle série d'œufs de canards mulards dans 4 incubateurs différents :

- 1 incubateur dans les conditions « contrôles » (37,6°C)
- 1 incubateur avec une hausse de 1°C, 16h/24h du 13eme au 27eme jour embryonnaire (reproductibilité de l'expérience ayant déjà montré son efficacité)
- 2 incubateurs avec 2 nouvelles conditions de hausse de température (selon les résultats des essais de l'objectif n°1) (optimisation)

Après l'éclosion, un maximum de 500 animaux sera placé dans des loges de 18m² (à raison de 45 animaux maximum par loge, assurant ainsi 0,4m² par animal), avec un accès extérieur de 6m². De 8 à 12 semaines, les canards suivront un rationnement alimentaire horaire (accès aux aliments limité à 1h par jour, avec un accès illimité aux abreuvoirs). A l'âge de 12 semaines les animaux seront placés par groupe de 4 en cage de 0,8x0,8m (soit 0,16m² par animal, dérogation aux conditions d'hébergement

tolérée pour une durée limitée et avec une surface au sol d'au moins 0,75m² selon l'arrêté du 01/02/2013) et gavés quotidiennement à raison de deux repas par jour, pour un total de 19 ou 21 repas. Notre précédente étude montrait une hausse de production de foie gras après 21 repas de gavage, chez nos groupes traités avec une hausse de température d'incubation. Les poids de foie seront donc mesurés après 19 (optimisation) et 21 (reproductibilité) repas de gavage. Pour les mesures après 19 repas, nous prévoyons d'utiliser 38 animaux par groupe, soit 152 animaux. Pour les mesures après 21 repas de gavage, nous prévoyons également d'utiliser 38 animaux par groupe, soit 152 animaux. Les mesures de poids seront appliquées 10h après le dernier repas de gavage, car le jeûne permet une qualité sanitaire des carcasses (absence de contenu dans les intestins, permettant de limiter les contaminations) et parce que les poids et qualité de foie sont optimaux à ce moment-là (peu de perte de poids frais et après cuisson). Nous mesurerons également les poids de muscles (pectoraux et cuisses), et le poids de graisse abdominale dans le but d'étudier le métabolisme global des animaux.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de cette optimisation de production, nous prévoyons également d'utiliser 20 animaux par groupe (soit 80 animaux) 2h après le 21^{ème} repas de gavage (correspondant au pic de modification d'expression des gènes après un repas chez le canard mulard). Afin de comparer nos données à un « contrôle » nous abattons également 20 animaux par groupe n'ayant pas été gavés (80 animaux).

Ce second objectif nécessite donc l'élevage et le gavage de 384 canards mâles (152 + 152 + 80) et l'élevage et l'euthanasie de 80 canards mâles supplémentaires, soit 464 canards au total.

Réduction : le nombre d'animaux prélevés aux différents stades des deux expériences est réduit à son minimum pour espérer avoir des conclusions significatives. Seuls les mâles seront élevés et gavés pour l'expérimentation n°2, afin de suivre l'Indication Géographique Protégée (IGP).

Remplacement : Compte tenu de l'objectif zootechnique, les animaux ne peuvent pas être remplacés par des modèles *in vitro*.

Raffinement : Les œufs et canards feront l'objet d'une surveillance quotidienne. Toute manifestation de troubles comportementaux persistants entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation. Des chainettes seront mises à disposition dans les salles d'élevage afin de stimuler leur curiosité et le jeu, permettant de diminuer le stress potentiel et les comportements agressifs.

17493 Les cancers colorectaux (CCR) représentent la deuxième cause de mortalité par cancer actuellement en France. La survie à long terme est largement impactée par la présence de métastases à distance. Les sites métastatiques les plus fréquents pour le cancer du côlon sont le foie, les poumons et le péritoine, une membrane séreuse tapissant la cavité abdominale. Les métastases péritonéales, connues sous le nom de carcinose péritonéale (CP) sont associées à une survie à long terme plus sombre par rapport aux autres sites métastatiques. Dans des études antérieures, nous avons identifié au niveau du liquide du péritoine de patients atteints de CP des cellules tumorales organisées sous forme classique de cellules isolées (CI) et pour la première fois également sous forme de larges sphères tumorales (ST) constituées d'une centaine de cellules tumorales cohésives. Pour comprendre la différence entre les CI et les ST dans leur capacité à former une tumeur primaire et des métastases, le but de ce projet est de :

- comparer la capacité des CI et des ST à développer des métastases après injection des cellules tumorales dans la rate (intrasplénique)
- développer pour la première fois un modèle animal préclinique de CCR après injection de ST dans le rectum (orthotopique).

Le développement de ces méthodes s'inscrit pleinement dans la mise en place de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux, puisqu'une grande partie des expériences seront faites sur des explants *ex vivo* (organoïdes) et par des tests d'invasion *in vitro* (gel 3D collagène), ce qui permet, entre autres, d'utiliser moins d'animaux, pour effectuer des panels de tests et de caractérisation très importants (réduction et remplacement). Le bien-être des souris sera respecté en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques ; l'hébergement comprendra un enrichissement avec des cotons (raffinement). Une planification statistique a permis de réduire le

nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude (réduction). Le nombre total de souris pour ce projet est de 86 souris sur 18 mois

17494 De nombreuses plantes médicinales sont connues et utilisées pour leurs propriétés antioxydantes, hypolipémiantes et anti-inflammatoires. Elles contiennent des principes actifs, tels que des polyphénols et phytostérols qui contribuent à leur bioactivité (cardioprotectrices, anti-inflammatoires, hypolipémiantes). Cette bioactivité est dépendante de la biodisponibilité qui regroupe à la fois les données relatives à l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion des principes actifs (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 et leur répartition dans les organes (foie, cœur, vaisseaux, tissu adipeux) et dans l'urine. Une fois la présence des métabolites confirmée dans les différents organes, il est nécessaire d'évaluer la bioactivité des tisanes. A ce jour, la plupart des connaissances relatives à l'efficacité des tisanes reste d'ordre empirique.

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 et leur efficacité dans la prévention ou le traitement de complications métaboliques.

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 (taux trop élevés de lipides circulants dans le sang) favorisant l'apparition de l'athérosclérose. L'athérosclérose se définit comme le durcissement et l'obstruction progressive des artères à cause de dépôts lipidiques formant ce que l'on appelle des « plaques d'athérome ». Cette maladie ne présente pas de symptôme visible jusqu'à la survenue d'évènements cardiovasculaires graves comme l'accident vasculaire cérébral (AVC) ou l'ischémie (interruption de la circulation sanguine à cause d'un caillot). De plus, elle est favorisée par des facteurs comme les dyslipidémies.

L'expérimentation que nous souhaitons réaliser a pour but d'étudier la bioactivité et la biodisponibilité des principes actifs de quatre plantes médicinales sur un modèle murin d'athérosclérose. Ce modèle nommé LDLR^{-/-} est une lignée de souris génétiquement modifiée qui ne présente pas de récepteur permettant aux cellules de « capter le mauvais cholestérol » (LDL-cholestérol), de ce fait ces souris présentent des taux de cholestérol plasmatiques très élevés et ont tendance à former des plaques d'athérome lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en cholestérol.

Les questions auxquelles ce projet doit répondre sont les suivantes :

Biodisponibilité

-Quel est le devenir des principes actifs de tisanes une fois consommées ?

-Quel est l'impact de la consommation de tisane sur les taux de métabolites circulants ?

Bioactivité

-Quel est l'impact d'une consommation chronique de tisane sur :

•Les taux de lipides circulants ?

•L'état inflammatoire ?

•Le processus de formation de plaques d'athérome

•Les paramètres cellulaires (comme la production de molécules de détresse ou de molécules antioxydantes)

Les plantes médicinales choisies pour cette étude sont *Psiloxylon mauritianum*, *Nuxia verticillata*, *Dodonaea viscosa* et *Aphloia theiformis* traditionnellement consommées sous forme de tisane et inscrites à la Pharmacopée Française (Liste A). Pour notre étude, des tisanes (décoctions) de ces plantes seront évaluées pour leurs potentiels effets hypolipémiants, anti-inflammatoires ou encore antioxydants.

Notre stratégie d'étude est la suivante :

Cette étude permettra aussi la mise en place d'un nouveau modèle chirurgical d'induction de l'athérosclérose chez la souris LDLR-/- nourrie avec un régime riche en cholestérol au laboratoire.

La mise en place du modèle se fera en parallèle de l'étude. Après une semaine d'habituation par gavage à l'eau, les souris consommeront des tisanes de plantes médicinales 3 fois par semaine (gavage). Ces opérations se feront sur 5 semaines (+1 semaine d'habituation) au minimum. Tous les groupes de souris suivront un régime supplémenté en cholestérol afin de favoriser la formation des plaques d'athérome. Une manipulation visant à générer une légère lésion au niveau de la carotide sera effectuée afin d'accentuer l'accumulation des lipides sur une zone localisée aboutissant à la formation d'une plaque d'athérome. Notre modèle constituera donc un modèle de formation accéléré d'athérosclérose.

Pour cette étude, 50 jeunes souris mâles LDLR-/- (lignée transgénique dérivée de la souche C57BL/6). (Âgées de 8 semaines) seront nécessaires. L'utilisation de jeunes souris est essentielle pour cette étude car nous souhaitons étudier l'effet préventif que pourraient avoir les tisanes sur la formation de plaques d'athérome. Or, le modèle LDLR-/- nourri avec un régime riche en cholestérol est connu pour générer très rapidement des plaques.

Voici les méthodes utilisées pour respecter la méthode des 3R :

*Optimiser le nombre d'animaux utilisés pour l'expérience et de réaliser des groupes avec un nombre adapté de souris. Ce projet s'appliquera en deux temps : un groupe d'animaux d'entraînement (n=10) suivra toutes les procédures sur une durée de 6 semaines. Ce groupe permettra de valider le modèle et d'observer l'état des plaques d'athérome à la suite d'un régime riche en cholestérol. A l'issue de cette expérimentation les autres groupes seront testés avec un nombre moins important de souris (n=8) (Réduction)

Une étude pilote portant sur la bioactivité des plantes médicinales sur 12 souris apoE-/- a confirmé la non-toxicité de ces tisanes sur le modèle murin d'athérosclérose.

* Avant le début de l'expérimentation, les souris suivront une étape d'habituation pendant une semaine afin d'être familiarisées aux procédures de gavage de mise à jeun. Pour les procédures chirurgicales, les animaux recevront une dose d'analgésique afin de prévenir les douleurs per et post-opératoires. (Raffinement)

* 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 indispensable dans notre cas : elle permet d'avoir des informations qualitatives et quantitatives sur le devenir des principes actifs une fois métabolisés par un organisme. Notre étude de la bioactivité implique la mise à mort de l'animal et le prélèvement des organes d'intérêt. Une alternative à l'expérimentation animale a été recherchée mais les méthodes possibles (digestion *in vitro*, étude chez l'Homme) ne permettent pas de répondre à nos problématiques. L'étude de la biodisponibilité et bioactivité nécessite des observations sur un organisme entier. (Remplacement)

17495 Chez de nombreux patients atteints d'un lymphome (cancer du système lymphatique), le traitement mis en place s'avère efficace pendant plusieurs semaines, mois ou même années, induisant une diminution de la tumeur. Mais, au bout d'un certain temps, le traitement devient inefficace chez une majorité des patients, conduisant alors à une rechute de la maladie. Cela signifie que certaines cellules cancéreuses exposées au traitement ont développé une résistance à ce traitement.

Pour étudier ce type de phénomène, une des méthodes consiste à implanter une tumeur humaine chez une souris immunodéprimée (afin que le tissu humain ne soit pas rejeté) puis d'administrer l'agent thérapeutique. Dans une première étape il s'agit de déterminer si un type de tumeur donnée répond de façon efficace à un type de traitement donné. Avec ce projet il est prévu d'étudier plusieurs types de lymphomes humains et plusieurs molécules thérapeutiques, certaines déjà approuvées chez l'homme et d'autres en cours de développement.

Pour ce faire, des cellules de lymphome seront implantées chez des souris pour qu'elles développent une tumeur. Puis ces souris seront traitées avec les agents thérapeutiques d'intérêt.

Certains modèles de lymphomes seront d'emblée résistants aux traitements (résistance « primaire ») et d'autres seront initialement sensibles aux traitements. Après avoir identifié des types de lymphome répondant à certains traitements il sera possible de développer des modèles de résistance.

Pour ce faire les types de lymphome sensibles seront implantés chez des souris et le traitement administré à une dose qui induit une diminution de la vitesse de croissance de la tumeur mais pas une régression complète (dose subcurative) Après un certain temps les tumeurs seront prélevées et réimplantées chez de nouvelles souris (on parle de passage), et le traitement à nouveau administré. Après plusieurs passages successifs les tumeurs deviennent résistantes au traitement d'intérêt (résistance acquise)

Dans le cadre de ce projet, il est prévu de développer et caractériser une banque de tumeurs d'origine humaine qui ont développé une résistance à un ou plusieurs types de traitement anticancéreux. Ces modèles de résistance permettront par la suite de mettre au point et tester de nouveaux traitements innovants potentiellement capables de contourner cette résistance. La finalité de ces études est de proposer des traitements à usage humain.

Les animaux utilisés pour ce projet seront des souris SCID CB17, une souche immunodéprimée dans laquelle la greffe d'une tumeur humaine est réalisable.

Pour ce projet nous prévoyons d'utiliser 2265 souris SCID CB17 sur 5 ans.

Il a précédemment été démontré que des cellules rendues résistantes *in vitro* ne représentaient pas la situation observée chez l'homme, notamment parce que la situation *in vitro* ne permet pas d'étudier les nombreux paramètres influençant l'élimination et la dégradation du médicament dans l'organisme, ni sa bonne pénétration dans la tumeur. L'étude de l'efficacité et des effets physiologiques induits par un traitement doit ainsi être réalisée à l'échelle d'un organisme entier. Le recours à l'animal est donc indispensable pour l'établissement de modèles tumoraux pertinents pour l'étude de nouveaux traitements.

La mise au point des modèles et les essais de traitement seront réalisés sur le nombre minimal de souris nécessaire et la confirmation des résultats sera réalisée sur le nombre minimal d'animaux permettant une analyse statistique pertinente.

Toutes les études de ce projet seront conduites par des expérimentateurs qualifiés.

Avant le début de chaque étude les animaux bénéficieront d'une période d'acclimatation et d'habituation aux expérimentateurs de 7 jours minimum afin de limiter leur stress. Pour détecter le plus précocement possible tout signe de douleur ou de détresse ils seront inspectés trois fois par semaine par le manipulateur pour détecter le plus précocement possible tout signe de douleur ou de détresse et les paramètres tumoraux seront évalués trois fois par semaine par les expérimentateurs pendant la durée de l'expérience. Les points limites fixés sont suffisamment prédictifs pour limiter au maximum la douleur et le stress. Les actes chirurgicaux se feront sous anesthésie et un traitement analgésique sera administré pour réduire la douleur post-opératoire. En cas d'apparition de signes de douleur, un traitement analgésique sera administré.

17496 Les reins sont les organes qui assurent la filtration du sang et la production de l'urine. Chaque rein est constitué d'environ un million d'unités distinctes, les néphrons. Chaque néphron comporte un glomérule et un tubule. Les néphrons sont séparés les uns des autres par le tissu interstitiel. L'urine formée dans les reins est transportée par les uretères jusqu'à la vessie où elle est stockée jusqu'à son élimination. Le glomérule est l'unité spécialisée dans l'ultrafiltration du plasma pour l'élaboration de l'urine primitive dans le cortex rénal. Les podocytes (cellules du glomérule) et leurs pédicelles (prolongements) forment un premier maillage pour obtenir cette urine primitive. Lorsqu'un dysfonctionnement des podocytes et pédicelles apparaît, une néphropathie se développe. Cette néphropathie est caractérisée par une protéinurie progressive induisant un œdème et le développement d'une inflammation tubulo-interstitielle et une fibrose rénale. Elle est présente dans différentes pathologies comme le diabète, le syndrome néphrotique idiopathique et d'autres pathologies caractérisées par une glomérulosclérose focale segmentaire. Dans la pathologie chronique où la glomérulosclérose et la fibrose sont installées, les traitements actuels permettent de ralentir l'avancée de la pathologie mais pas de réparer les

dommages. En dernier recours, le patient devra subir une thérapie de remplacement d'organe (dialyse ou transplantation de rein).

Afin d'évaluer de nouveaux candidats médicaments, des modèles animaux reproduisant cette pathologie sont développés dont un modèle de néphropathie induit par l'administration d'un agent antinéoplasique. Cet agent antitumoral à large spectre d'action chez l'homme, induisant des dommages rénaux et particulièrement au niveau de podocytes dans le glomérule. Les modifications morphologiques des glomérules observées chez le rat traité avec cette molécule, sont alors proches de celles observées chez l'homme au cours des syndromes néphrotiques.

L'efficacité des traitements préventifs ou curatifs restant un enjeu majeur pour la recherche pharmacologique, l'objectif de ce projet est de pouvoir évaluer l'effet de candidats médicaments et/ou de molécules de référence sur la perte de fonction et sur les dommages glomérulaires induit par l'agent antitumoral.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 900 rats à raison de 15 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou de doses à tester.

Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R :

Remplacement : A l'heure actuelle, seule la thérapie de remplacement d'organe (dialyse ou transplantation) permet de traiter les dommages glomérulaires et la fibrose. Aucune thérapie efficace n'existe pour prévenir ou traiter ces lésions. Cela rend donc nécessaire l'utilisation d'un modèle animal afin de mimer au mieux la situation clinique chez l'homme et de trouver des candidats médicaments efficaces pour le traitement de pathologies rénales

Réduction : Nous avons de par notre expérience limiter le nombre d'animaux par groupe afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. De plus 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.

Raffinement : 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 aspen bricks (morceaux de bois) ou des tunnels en polycarbonate). Les animaux seront nourris ad libitum et hébergés en groupe; ils ne seront séparés qu'en cas de comportement agressif. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours, le suivi étant assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie le week-end. Une attention particulière sera apportée lors des traitements des animaux par des candidats médicaments afin de déceler le plus rapidement possible l'apparition d'effets indésirables ou secondaires suite à ces administrations. De plus, si un animal avait des altérations de ces fonctions normales (impossibilité d'uriner, de se nourrir, de boire, de se déplacer), s'il présentait une souffrance/angoisse (vocalisation, prostration, poils hérissé), il serait isolé afin de le réhydrater et de le soigner. Si au-delà de 48 à 72 heures son état ne s'améliorait pas il serait exclu de l'étude et mis à mort.

Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

17497 Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 466 millions de personnes dans le monde souffrent d'une déficience auditive handicapante, dont 34 millions d'enfants. D'ici à 2050, près d'une personne sur 10 sera atteinte d'une déficience auditive pouvant affecter sa capacité de communiquer. Seule une prise en charge précoce de la perte d'audition peut préserver le lien social et prévenir les risques d'isolement et de perte d'autonomie. D'un point de vue clinique, les bénéfices apportés par l'utilisation de prothèses auditives (dans le cas des surdités légères) ou d'implants cochléaires (dans les cas de surdités sévères ou profondes) sont partiels. La thérapie génique est l'une des pistes alternatives explorée depuis quelques années pour soigner les déficits auditifs précoces et profonds. Notre objectif est d'évaluer l'effet d'une telle approche dans un modèle de déficit auditif progressif à déclenchement tardif. Nous testerons deux stratégies de transfert de gènes (via des vecteurs viraux ou via des liposomes) dans

des souris génétiquement modifiées (déjà créées ou à créer, mâles et femelles, nouveau-nés et adultes). L'absence de système alternatif *in vitro* ou *ex vivo*, capable d'intégrer les mécanismes complexes impliqués dans le fonctionnement de l'oreille interne, rend incontournable l'utilisation de modèles animaux pour tester l'efficacité de notre approche thérapeutique.

Notre projet s'articule autour de 6 procédures qui nécessiteront l'utilisation de 3030 souris sur 5 ans, dont 450 en procédure de classe légère et 2580 en procédure de classe modérée. Pour déterminer ce nombre, nous avons retraité les données issues de souris normales et déficientes avec l'outil statistique G*Power. Nous injecterons un microlitre de vecteur dans l'oreille interne des souris déficientes, soit au niveau du vestibule (organe sensoriel de l'équilibre), soit au niveau de la cochlée (organe sensoriel de l'audition). Ces injections se feront sous anesthésie gazeuse et traitement antalgique. Une incision de 2 à 5 millimètres de la peau dans la région post-auriculaire nous permettra l'accès au site d'injection. L'état général des souris opérées sera régulièrement suivi afin de prévenir tout signe de souffrance ou d'inconfort. Après l'injection les souris seront soumises à des tests comportementaux non invasifs, suivis par des tests auditifs réalisés sous anesthésie profonde.

17498 Les coronavirus sont couramment associés à des infections respiratoires aiguës chez l'homme. 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 XXIème 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. Il est à l'origine d'une pneumonie atypique pouvant être mortelle. Les personnes infectées continuent de propager le virus à travers le monde et plus d'un million d'humains en sont déjà décédés. Les premiers candidats vaccins, manifestant des efficacités partielles, sont entrés en essais cliniques. Certains ont donné lieu à des effets secondaires. Des candidats vaccins de plus grande efficacité et d'innocuité sont donc nécessaires contre cette pandémie qui se prolonge.

Les vecteurs lentiviraux (VL) sont des vecteurs vaccinaux particulièrement efficaces pour l'induction de réponses immunitaires. Nous avons généré des candidats vaccins basés sur l'expression de protéines issues du virus SARS-CoV-2 par ces vecteurs lentiviraux. Les premiers résultats obtenus chez la lignée de souris de laboratoire *Mus musculus* C57BL/6 montrent que la vaccination par les vecteurs lentiviraux induit de forts taux d'anticorps neutralisants. Même si cette composante humorale est essentielle pour la protection, des réponses immunitaires cellulaires capables de détruire les cellules infectées au niveau des poumons sont requises pour une action complète du vaccin. Un vaccin induisant une réponse cellulaire contre des antigènes conservés chez les coronavirus aura également l'avantage de pouvoir protéger contre un éventail plus large de coronavirus. Ce projet consiste donc à définir un VL capable d'induire une réponse immunitaire complète contre le SARS-CoV-2. Ce vaccin sera ainsi non seulement capable d'induire des anticorps pour neutraliser le virus mais également capable de détruire les cellules infectées. Pour refléter la diversité des réponses immunitaires induites chez l'homme, nous allons étudier les réponses immunitaires chez différentes lignées de souris. La souris de type sauvage n'est pas naturellement infectable par le SARS-CoV-2. Afin d'évaluer la protection contre ce virus, les souris seront prétraitées par un vecteur adénoviral codant pour le récepteur humain du SARS-CoV-2, (human Angiogenesis Converting Enzyme 2 ; hACE2). Alternativement, des souris transgéniques exprimant ce récepteur hACE2 seront utilisées.

Dans une première procédure de sévérité modérée incluant 85 souris, nous validerons l'importance de l'induction d'une réponse cellulaire pour protéger de l'infection contre le SARS-CoV-2 en utilisant nos candidats vaccins déjà identifiés dans une lignée de souris dépourvues de cellules productrices d'anticorps. Dans une deuxième procédure de sévérité légère comportant 240 souris, nous rechercherons de nouveaux candidats vaccins capables d'induire à la fois une réponse humorale et cellulaire. Deux dernières procédures de sévérité modérée effectuées au maximum sur 480 et 720 souris nous serviront à montrer l'effet prophylactique des vecteurs vaccinaux sélectionnés contre l'infection par le coronavirus SARS-CoV-2 dans ces nouveaux modèles.

L'efficacité de la protection vaccinale sera jugée par l'analyse comparée de la charge virale chez des animaux vaccinés et non vaccinés. En cas de protection, les réponses cellulaires impliquées pourront être caractérisées et nous permettront de déterminer la diversité, la quantité et la spécificité des

réponses cellulaires nécessaires à la protection. Ces expériences seront menées dans un premier temps chez les souris femelles. Si un candidat vaccin est identifié, les expériences de protection seront répétées chez des souris mâles afin de pouvoir conclure à l'efficacité du vaccin sur les deux sexes.

Ce projet a été conçu 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.

Réduire: Pour calculer la taille des groupes d'animaux injectés par les vecteurs lentiviraux ou infectés par le SARS-CoV-2, nous avons utilisé les données statistiques types de nos expériences antérieures. Nous avons planifié d'inclure le nombre minimal d'individus/groupe expérimental qui permettra une analyse statistique pertinente et concluante basés sur des tests statistiques appropriés, recommandés par un expert en bio-statistiques. Le nombre estimé d'animaux utilisés dans ce projet est de 1525 souris, inclus dans 4 procédures expérimentales sur une période de 5 ans.

Raffiner: Les souris de type sauvage sont relativement résistantes à cette infection, ce qui nous permet de minimiser la souffrance animale tout en évitant l'utilisation d'animaux de plus grande taille et de plus grande sensibilité. Lors des expériences chez les souris infectées par le coronavirus SARS-CoV-2, une surveillance quotidienne sera mise en place à partir du jour 2 après l'épreuve par le virus. Tout en respectant les conditions qui permettent au projet de recherche d'atteindre ses objectifs, nous définirons à l'avance des points limites afin d'éviter toute souffrance animale. La cage des animaux comportera, comme élément d'enrichissement, du coton dentaire pour que les animaux puissent construire un nid. Les expériences ne nécessitent aucune médication et seront réalisées par des expérimentateurs formés. Aucun dommage pour les animaux n'est attendu. Cependant, certains signes cliniques ont été définis comme points limites. Les animaux seront mis à mort dès que ces points limites sont atteints.

17499 L'encéphalopathie hypoxique-ischémique néonatale (EHI) est une affection du cerveau due à une diminution de l'apport en oxygène. Elle fait suite à une asphyxie à la naissance et est une cause majeure de décès ou d'invalidité à long terme chez les nouveau-nés nés à terme. Elle affecte 1 à 4 décès pour 1 000 naissances vivantes et par conséquent 30 000 nourrissons / an en Europe. L'incidence et les conséquences de l'EHI sont encore plus courantes et graves dans les milieux défavorisés, touchant environ 1 million de nourrissons chaque année dans le monde.

Au cours des dernières années, l'hypothermie thérapeutique est devenue la norme de soins pour améliorer le devenir des bébés après des lésions hypoxiques-ischémiques périnatales. Mais, malgré l'hypothermie et les soins intensifs néonataux les plus modernes, 45 à 50% des enfants atteints d'EHI modérée ou grave meurent ou souffrent d'une déficience neurodéveloppementale à long terme.

Par conséquent, une optimisation précoce supplémentaire des soins périnataux en plus de l'hypothermie est nécessaire afin d'améliorer la prise en charge de l'EHI.

C'est pourquoi nous aimerions utiliser un modèle d'EHI chez le raton afin de tester une nouvelle stratégie de protection. Ce modèle, utilisé dans de nombreuses études scientifiques, induit des lésions cérébrales similaires à celles retrouvées chez les nourrissons humains touchés par une EHI.

Afin de potentialiser les effets neuroprotecteurs de l'hypothermie, nous aimerions la coupler avec l'injection dans le péritoine (injection intrapéritonéale) d'une molécule qui a une action bénéfique sur ce modèle par la modulation du débit sanguin cérébral.

Notre protocole sera le suivant : induire les lésions cérébrales sous anesthésie par ligature d'une carotide (ischémie) puis mise de l'animal sous 8% d'oxygène pendant 2h (hypoxie).

Un traitement sur animal vigile sera ensuite dispensé à une partie des animaux : hypothermie (abaissement de la température corporelle en dessous de 33°C grâce à l'utilisation d'un caisson mis dans un bain marie) + injection intrapéritonéale de la molécule.

Nous désirons ensuite comparer les lésions cérébrales des animaux qui n'ont pas reçu de traitement à ceux ayant subi le traitement et particulièrement les molécules inflammatoires.

Les animaux seront utilisés à 10 jours de vie, et euthanasiés à 13 et 17 jours de vie afin d'analyser leur cerveau.

Nombre d'animaux utilisés : il est prévu d'utiliser 366 rats. Nous désirons mener le projet sur 4 ans.

Afin de respecter la règle des 3 R notre projet comprend :

- remplacer : désirant étudier le développement cérébral général, il est impossible de remplacer les expérimentations *in vivo* de cette étude par des expérimentations alternatives. En effet, le tissu cérébral est extrêmement complexe et de nombreuses cellules différentes sont en interaction lors de son développement. Il n'existe pas de modèles *in-vitro* ou d'organoïdes suffisamment représentatifs pour le développement cérébral.

- réduire : pour utiliser le nombre d'animaux juste pour cette étude nous nous sommes basés sur les résultats des études antérieures sur ce modèle. Il s'avère que la quantité de 12 animaux / groupe est la quantité adéquate pour nos analyses. Une fois les données relevées, des tests statistiques sont prévus pour la comparaison des différents groupes.

- raffiner : Les animaux seront suivis durant tout le processus opératoire : utilisation d'un tapis chauffant, vérification de leur température corporelle, vérification de l'acceptation lors de la remise à la mère. Des critères d'arrêt ont été définis et seront utilisés, entraînant l'euthanasie de l'animal si ils sont atteints. L'ensemble des animaux sera suivi par le personnel qualifié de l'animalerie, avec attention à la croissance et à l'aspect des rats tout au long de l'étude. La surveillance est effectuée chaque jour weekend compris.

17500 La chirurgie de l'oreille moyenne est le traitement de référence des surdités de transmission (perforations tympaniques, otospongiose, otite chronique, cholestéatome, réparation de la chaîne des osselets). Une des complications de la chirurgie de l'oreille moyenne est une dégradation inattendue de l'audition, pouvant être due à des mouvements involontaires de la chaîne des osselets. Ces mouvements involontaires peuvent être limités par l'entraînement ou par des techniques chirurgicales de soutien, ou supprimés par la chirurgie robotique.

Quelques études ont été menées afin de définir les forces que pouvaient supporter les osselets de la chaîne des osselets (marteau, enclume et étrier) et celles qui menaient à des micro ruptures puis des ruptures des ligaments attachant ces osselets. Ces études ont mesuré *in vitro* les répercussions anatomiques d'une manipulation sur la chaîne des osselets, mais n'ont donné aucune information sur les conséquences fonctionnelles sur la fonction de l'audition de l'oreille interne.

Afin de prévenir ce risque de perte auditive, une protection pharmacologique par médicaments anti inflammatoires est souvent utilisée de manière empirique. Nous avons développé en collaboration avec des pharmaciens un médicament sous forme de gel dont on attend une meilleure efficacité.

Cette étude a pour objectif d'évaluer la relation entre les traumatismes des osselets et la perte auditive sur modèle animal (cobaye) pour identifier un seuil au-delà duquel une micro rupture induit une perte auditive. L'utilité d'un gel d'acide hyaluronique chargé en corticostéroïdes sera évaluée dans ce modèle pour prévenir la dégradation de l'audition pendant la chirurgie. C'est un gel biocompatible, biodégradable qui possède des propriétés cicatrisantes.

Une étude préliminaire, non incluse dans ce projet, sur des pièces anatomiques humaines d'oreille nous permettra de définir et mesurer une plage de forces applicables à la chaîne des osselets ne présentant pas de risque de lésions ligamentaires et pouvant servir de seuil d'alerte pour le chirurgien. Ces seuils seront utiles pour la partie *in vivo* de l'étude.

A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'étude de l'audition. Nous avons choisi le modèle animal cobaye pour réaliser les mesures *in vivo* dans ce projet car l'anatomie de leur oreille est très proche de celle de l'humain.

L'étude a été centrée sur le dernier osselet de la chaîne des osselets afin de réduire le nombre de cobayes nécessaires. Les tests statistiques utilisés seront, selon les variables analysées des tests t de Student, Fisher ou ANOVA. Le nombre total d'animaux a été réduit au maximum et sera adapté selon les résultats obtenus. Des groupes de 5 animaux par expérience sont suffisants pour s'assurer de la reproductibilité du geste, l'analyse portant sur un critère unique (mesure d'audition). Nous utiliserons en tout 102 cobayes.

Les gestes techniques sont soit pratiqués sous anesthésie générale, soit non douloureux (en post opératoire). Avant la chirurgie, des antalgiques seront administrés à l'animal de façon préventive. Après anesthésie générale, un mouvement calibré et prédéfini sera appliqué sur l'étrier par les outils microchirurgicaux robotisés. L'audition sera testée de façon objective sur les animaux, avant et après la chirurgie, grâce à un appareil de mesure des potentiels évoqués auditif. L'état général des cobayes sera surveillé, en particulier après la chirurgie grâce à une grille de score incluant le poids, le comportement, l'état de la cicatrice et l'apparence physique ; sur cette base, un traitement antalgique sera administré si besoin. Une perte d'audition légère à modérée est attendue. La sévérité de la seule procédure expérimentale de ce projet est donc légère.

Tous ces travaux ne sont possibles qu'aujourd'hui grâce au développement de robot conçu dans notre laboratoire. Ce robot est depuis cette année utilisé sur des patients afin d'améliorer leur chirurgie. Ce travail de recherche permettra d'accroître la sécurité de la chirurgie. Nous avons centré notre étude sur l'étrier : le dernier osselet de la chaîne, souvent sollicité en chirurgie. Il transmet l'onde sonore de l'étrier à l'oreille interne. Tout traumatisme de l'étrier, pourrait causer une perte auditive neurosensorielle irréversible.

17501 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) induit un déficit immunitaire chronique responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Les traitements actuels utilisent des molécules antirétrovirales permettant de contrôler le virus sur le long terme sans toutefois conduire à son élimination complète. Le virus persiste à l'état latent dans les cellules de l'organisme, dans de nombreux sites anatomiques disséminés dans tout le corps où ces molécules semblent peu pénétrer. Ces sites constituent des réservoirs viraux où les cellules infectées peuvent se réactiver et produire de nouveaux virus.

Actuellement, l'un des enjeux médicaux est l'obtention d'une guérison fonctionnelle, aussi nommée « rémission », qui consiste en une absence de progression clinique, sans traitement. La communauté scientifique s'accorde sur le fait que la taille des réservoirs viraux est un facteur clé pour obtenir une rémission. Une stratégie pour réduire la taille de ces réservoirs repose sur une mise sous traitement précoce des personnes infectées et l'utilisation de nouvelles combinaisons de molécules antirétrovirales plus efficaces et pénétrant mieux dans les tissus. Le développement de telles molécules nécessite au préalable de mieux comprendre, au niveau de l'organisme dans son entier, l'activité des molécules actuellement utilisées en clinique qui n'empêchent pas la constitution des réservoirs viraux.

L'objectif de ce projet est de caractériser la diffusion de molécules antirétrovirales conventionnelles dans différents tissus et cellules de l'organisme et d'évaluer si elles sont capables d'atteindre les réservoirs viraux. Ce travail permettra d'obtenir une cartographie précise et complète de leur biodistribution, du virus et des lésions associées, et ainsi d'améliorer nos connaissances sur les interactions entre les molécules antirétrovirales et le virus et sur les réservoirs viraux pour le développement de nouveaux traitements.

Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH). Il est aujourd'hui impossible de reproduire *in vitro* la complexité d'une infection par le VIH et la diffusion de molécules entre les différents compartiments de l'organisme. Le recours à un modèle animal est nécessaire pour apporter un maximum d'informations qui permettraient de mieux adapter les traitements chez l'Homme et d'identifier de nouvelles pistes de recherche pour les médicaments de nouvelle génération. Les PNH, par leur proximité génétique avec l'être humain, est le modèle le plus pertinent pour obtenir des résultats prédictifs et transposables à l'homme. De plus, leur infection par des souches pathogènes du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) reproduit l'infection humaine par le VIH.

Les étapes de ce projet sont :

- de caractériser la diffusion des molécules antirétrovirales dans les tissus et les cellules de modèles PNH traités avec des molécules de référence utilisées chez l'homme
- de mettre en évidence des différences de distribution tissulaire des molécules en fonction des changements physiologiques (mâles et femelles, âge) et du contexte pathologique lié à l'infection par le virus SIV

- d'étudier la relation entre la diffusion des molécules antirétrovirales dans les tissus et la réplication résiduelle du virus SIV
- de développer des méthodes non invasives de suivi au cours du temps des molécules antirétrovirales et du virus SIV en utilisant des techniques d'imagerie *in vivo*
- de produire les données de pharmacologie et pharmacocinétique des molécules radiomarquées pour permettre la transposition des résultats à la réalisation d'essais cliniques.

La mise en œuvre de méthodes non invasives d'imagerie pour le suivi au cours du temps de la biodistribution des molécules antirétrovirales et du virus permet de réduire le nombre d'animaux impliqués. La biodistribution sera estimée par imagerie TEP-TDM après administration d'analogues radiomarqués des antirétroviraux et de molécules radiomarquées ciblant spécifiquement le virus SIV. Les développements technologiques réalisés au cours de ce projet permettront la mise en place d'essais cliniques. Les techniques d'imagerie seront également utilisées pour caractériser les sites d'inflammation persistante induite par l'infection qui pourraient modifier la distribution des médicaments.

Il est prévu d'utiliser au maximum 111 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu sur une durée de 5 ans (soit en moyenne 22 animaux/an). Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique des résultats. 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 au sacrifice des animaux pour évaluer au cours du temps la biodistribution des molécules antirétrovirales et du virus SIV, manipulations sur l'animal sous anesthésie générale). Des critères d'arrêt sont prévus pour prendre en compte d'éventuels effets inattendus et en cas de progression de la maladie induite par le SIV, ce qui permettra d'intervenir immédiatement, avec un recours au vétérinaire de l'installation pour mettre en œuvre les traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en groupe avant l'initiation des études puis en hébergements individuels dans des modules contigus permettant des interactions sociales pendant les études. Ils bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie et qui sera renforcé lors des phases d'hébergement individuel.

17502 Les principes de la perception sensorielle demeurent aujourd'hui une importante question expérimentale et théorique. Notre équipe développe des modèles dérivés directement de l'activité des systèmes sensoriels pour décrire les opérations sous-tendant la perception. Nous nous intéressons tout particulièrement à la perception auditive, mais aussi à ses liens avec d'autres modalités sensorielles et à la généralisation des principes déduits dans une modalité vers une autre modalité. Nos modèles sont construits dans le cadre d'un autre projet sur la base d'enregistrements et de manipulations des circuits neuronaux chez l'animal en situation de perception passive, ce qui permet l'utilisation d'un grand nombre de stimuli. Pour valider les modèles, il est nécessaire de réaliser des mesures psychométriques (mesures de la perception) et neurométriques (mesures de l'activité neuronales) chez des animaux en situation de perception active et contrôlée. Par ailleurs, grâce à ces modèles et à la stimulation ciblée d'ensembles de neurones dans les systèmes sensoriels centraux, il est possible de construire des perceptions artificielles. Cette approche permettra peut-être de réhabiliter des patients en situation de déficit sensoriel, par exemple des personnes sourdes. Dans cette perspective, ce projet vise aussi à évaluer chez l'animal les performances perceptuelles obtenues par stimulation multicanaux du système nerveux central et à les comparer aux performances perceptuelles naturelles, afin d'estimer le potentiel thérapeutique de la stimulation du système auditif central.

Pour atteindre ces objectifs, nous réaliserons chez la souris :

1/ des mesures de la précision de la perception pour huit paramètres perceptifs différents, dont sept concernent la perception auditive et un autre la perception tactile, ce qui nous permettra de comparer les principes computationnels à l'œuvre dans les deux modalités sensorielles. Les paramètres auditifs incluent la hauteur (fréquence), l'harmonicité (combinaisons particulières de fréquences), la modulation (variations dans le temps) d'amplitude et de fréquence, la perception dans un bruit de fond, la perception d'irrégularités dans une séquence sonore et enfin la perception de la rugosité auditive

(modulation périodique d'amplitude) et tactile. La précision de perception de ces paramètres chez la souris sera mesurée sous forme de courbes de sensibilité de discrimination (dites courbes 'psychométriques') qui pourront être comparées à nos modèles.

2/ des mesures par imagerie ou par enregistrement électrique de l'activité des neurones des systèmes sensoriels centraux (cortex auditif et tactile) chez la souris en comportement pendant nos mesures psychométriques. Ces mesures ont pour but d'évaluer si les représentations neuronales des stimuli sont modifiées par l'engagement de l'animal dans la tâche perceptuelle par rapport à la situation de perception passive utilisée pour développer les modèles.

3/ des mesures de la précision de perceptions artificielles obtenues par trois méthodes de stimulation du cortex auditif pour les sept attributs de la perception auditive mentionnés plus hauts.

Les données de cette campagne de mesure seront mises à disposition de la communauté une fois analysées (mise en ligne via un serveur de données), permettant de réduire l'utilisation ultérieure d'animaux pour évaluer la perception auditive et tactile chez la souris.

Le projet repose sur deux procédures expérimentales de niveau modéré appliquées à 580 souris. La première procédure permet l'enregistrement et/ou la stimulation massive de neurones grâce à des méthodes optiques pendant la perception. La seconde procédure permet des enregistrements complémentaires par des méthodes électriques pour valider les conclusions de l'imagerie optique où accéder à des zones inaccessibles par imagerie. Ces procédures impliquent la pose chirurgicale d'un implant pour le maintien contention de l'animal pendant les mesures. Après une période de récupération de deux semaines au minimum, une restriction hydrique contrôlée de l'animal est mise en place pour maintenir sa motivation et son activité pendant la tâche comportementale permettant de réaliser les mesures perceptuelles.

L'approche expérimentale utilisée respecte les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement comme détaillé ci-après.

Remplacement : Les calculs implémentés par circuits neuronaux permettant de générer la perception sensorielle sont encore mal compris. Il existe des algorithmes permettant d'approcher ces fonctions (par exemple reconnaissance vocale), mais ils souffrent de nombreuses imperfections, et ne sont pas directement inspirés des circuits biologiques. Il reste donc essentiel d'utiliser des modèles animaux pour observer ces circuits pendant la perception avec une précision et une échelle suffisante pour décoder leur fonctionnement. Bien que la compréhension des mécanismes sous-tendant la perception de sons complexes est souvent étudiée chez des mammifères 'supérieurs' (marmouset, furet), il a été montré récemment qu'un grand nombre d'aspects de la perception des sons complexes sont présents chez la souris, ce qui permet de réaliser cette étude chez un modèle animal plus simple. Par ailleurs, des preuves de concept chez la souris de la stimulation centrale pour la réhabilitation auditive permettra de limiter le recours aux espèces primates pour l'exploration de la méthode, avant son application potentielle chez des patients humains.

Réduction : L'utilisation de méthodes d'imagerie optiques et d'électrophysiologie modernes permettant d'enregistrer plus de 1000 neurones en parallèles afin de limiter le nombre d'animaux utilisés pour échantillonner l'activité neuronale. Le nombre d'animaux utilisés est aussi minimisé par la possibilité de répéter le protocole de mesure sur plusieurs jours voire plusieurs semaines avec le même animal pour maximiser la taille de l'échantillon de neurones collecté sur chaque animal. Le nombre d'animaux utilisés est donc essentiellement déterminés par la nécessité de mesurer des différences statistiques significatives pour la comparaison des courbes psychométriques entre elles ou avec les modèles.

Raffinement : Les deux procédures expérimentales de ce projet impliquent une antalgie, des temps de repos, et un protocole de restriction hydrique appropriés pour minimiser la souffrance, ainsi qu'un suivi quotidien des animaux, et la définition de points limites précis basés sur des indicateurs de poids, d'aspect général et de comportement, entraînant l'arrêt de l'expérience ou la mise à mort s'il n'est pas possible de pallier immédiatement la souffrance de l'animal.

17503 Le muscle squelettique est le tissu le plus abondant du corps. Depuis plus de 15 ans, notre laboratoire étudie comment le muscle squelettique est formé au cours de l'embryogénèse, de la croissance post-

natale et de la régénération. Ces différentes étapes font appel à des cellules spécialisées appelées cellules souches.

Les cellules souches ont la propriété de générer des cellules différenciées qui assurent la fonction contractile du muscle, et de s'auto-renouveler afin d'assurer leur maintenance. Si certaines expériences d'analyse peuvent être établies *in vitro*, d'autres doivent impérativement être réalisées *in vivo* car aucun système *in vitro* ne permet à ce jour de reproduire fidèlement les conditions naturelles et complexes d'un tissu.

La compréhension du fonctionnement normal des cellules souches musculaires adultes est nécessaire pour définir l'origine de leur dysfonctionnement dans les pathologies musculaires, cancéreuses ou métaboliques. Notre laboratoire dédie ces recherches depuis près de 15 ans en ce sens.

Pour ce projet, nous souhaitons appliquer nos connaissances dans deux modèles d'amaigrissement et fatigue généralisée appelée cachexie : une induite par le développement d'une tumeur dans un endroit différent de son origine, dit ectopique, ou une cachexie induite par une sous-alimentation. Dans ces deux contextes, nous souhaitons étudier le métabolisme des cellules souches et leur capacité de régénération.

Nous avons développé des modèles de souris génétiquement modifiées qui nous permettent d'isoler les cellules souches musculaires afin de les étudier au niveaux cellulaires, moléculaires et fonctionnels.

Ce projet comporte deux procédures différentes une de classe sévère et une de classe modérée composées au total de 3 expériences pour 540 souris sur 5 ans. Elles comportent essentiellement des injections (entre les deux épaules ou au niveau du flanc) de cellules cancéreuses et des inoculations par voie orale (dans l'eau de boisson ou dans la nourriture des animaux) de substances de traçage du contenu génétique ou de recombinaison génétique.

Pour répondre aux règles des 3R, nous avons instauré :

1) dans le cadre d'un raffinement de nos expériences, un suivi régulier des animaux selon leur état général de santé et le développement des tumeurs. Dès l'apparition de signes cliniques, des actions adaptées seront entreprises : ajout de diet-gel ; réhydratation sous cutanée ; administration d'analgésique.

2) Nous avons remplacé une partie de l'administration de molécules chimiques en injection intra péritonéale par un ajout dans l'eau de boisson ou dans la nourriture des animaux afin de raffiner nos méthodes d'administration et éviter des injections répétées autant que possible

3) Nous avons réduit les effectifs au minimum tout en assurant l'atteinte des objectifs scientifiques, en consultant une équipe de statisticiens

Tous les animaux produits par notre élevage seront utilisés à des fins scientifiques pour approfondir nos connaissances sur les cellules souches des muscles squelettiques. Tout d'abord, nous mutualisons l'utilisation des différentes lignées génétiquement modifiées entre les différents projets de notre équipe de recherche. Les animaux non utilisés pour les études *in vivo* sont utilisés en reproduction ou pour les études *in vitro* en supplément des lignées cellulaires que nous possédons, afin de limiter le recours à l'animal.

17504 Les rongeurs représentent une menace en termes de santé publique depuis des siècles, et sont emblématiques de la pauvreté, du sous-développement et des épidémies. L'impact des rongeurs sur la santé est un phénomène global et multisectoriel, à travers les maladies, la malnutrition et les dommages causés aux infrastructures, et est estimé à 23 milliards d'euros par an (Jacob J, et al. Use of anticoagulant rodenticides in different applications around the world. In: N.W. van den Brink et al. (eds.), Anticoagulant Rodenticides and Wildlife, Emerging Topics in Ecotoxicology. 2018;5:11-43). L'expansion extraordinaire du commerce international, l'urbanisation incontrôlée, le déplacement massif des populations, ainsi que le changement climatique, ne font qu'accroître la nécessité de prévenir et de contrôler les conséquences de la prolifération des rongeurs sur la santé humaine. Le problème de la prolifération des rongeurs est également intimement lié à celui des droits de l'Homme et de la justice sociale. Il se situe en effet au carrefour de la pauvreté et de la santé publique, en lien avec 5 des 17 objectifs de développement durable. Ils peuvent ainsi, en Europe, mais aussi dans les

pays émergents où de fortes densités de rongeurs sont relevées dans les zones urbaines en extension, poser un grave problème de santé publique (40% des infections zoonotiques connues et à l'origine de 400 millions de malades chaque année, Meerburg BG, et al. Rodent-borne diseases and their risks for public health. Crit Rev Microbiol. 2009;35(3):221-270.), ou avoir ponctuellement un impact économique. Une lutte raisonnée est nécessaire contre ces espèces envahissantes. Elle est basée sur des stratégies d'hygiène, de conception des bâtiments, mais aussi sur une utilisation raisonnée de biocides destinés à tuer ces animaux.

Elle doit être adaptée aux situations, appétent et efficace, tenir compte des résistances des rongeurs à des produits anciens et surtout éviter les effets secondaires sur l'environnement et la faune domestique ou sauvage qui n'est pas visée.

Pour cela, les fabricants industriels ont mis au point des solutions formulées (appâts) contenant des anticoagulants car cette famille chimique permet de contourner, par un effet toxique différé, la méfiance des rongeurs et notamment du rat brun. Cette action différée contourne ainsi le phénomène d'aversion alimentaire chez les rongeurs et permet un délai d'action pour la prise en charge thérapeutique des animaux non-cibles intoxiqués. En outre, il existe un antidote qui permet de traiter les animaux domestiques qui ingèrent un appât accidentellement, si le cas est pris à temps.

Les fabricants ont l'obligation réglementaire de soumettre aux autorités compétentes des pays de commercialisation des données sur l'efficacité des appâts, produits finis, aussi bien en laboratoire que sur le terrain. En effet, même si les molécules actives sont identiques et que leur mode d'action général est connu et ne diffère pas, leur formulation en produit fini doit évoluer continuellement.

Un changement même minime d'une formulation, sans modification du principe actif, peut entraîner une modification de l'attractivité, et donc de l'efficacité des appâts. Or, les homologations concernent les produits finis et nécessitent donc le dépôt d'un dossier pour chaque nouvel appât.

Il faut ainsi, pour chaque nouvelle formulation, mener de nouveaux tests aux laboratoires et sur le terrain selon la Ligne Directrice de l'ECHA : European Chemicals Agency. Ces essais sont obligatoires afin de vérifier l'appétence et l'efficacité de chaque nouvelle formulation sur les rongeurs cibles.

Pour chaque nouvel appât nous réalisons un essai d'exposition de 10 rongeurs, à qui l'appât est proposé. Puis l'animal est suivi et observé, pour détecter l'apparition de signes d'intoxication.

Ces tests sont particuliers puisqu'ils visent à évaluer la capacité d'un produit à amener un animal à la mort. Cependant, forts d'une longue expérience de ces essais, nous déployons de grands efforts pour respecter la règle des 3R.

1/ Remplacement : la nature toxique du produit peut être évaluée *in vitro*. Nous avons aussi des processus d'assurance qualité qui attestent que le produit est conforme à sa définition initiale sans avoir recours à l'animal. Nous ne faisons appel à l'animal que quand aucune méthode *in vitro* n'existe : pour évaluer l'attractivité effective du produit, pour un animal qui n'a pas faim, et qui n'est pas obligé d'ingérer l'appât.

2/ Réduction : Le nombre d'animaux est défini par la Ligne Directrice de l'ECHA. Nous ne réalisons les tests que lorsque c'est nécessaire, lorsque le développement de l'appât est dans sa dernière phase.

3/ Raffinement : Nous avons identifié deux principaux impacts délétères de notre protocole : l'hébergement individuel et la toxicité du produit.

Nous sommes obligés d'héberger les rongeurs seuls, pendant l'essai, pour suivre la consommation d'appât avec exactitude. Toutefois, ils sont en groupe pendant la phase d'acclimatation et les cages individuelles sont transparentes et non couvertes par des filtres ce qui permet des communications visuelles et olfactives. Nous fournissons aux rongeurs des moyens de nidifier et de se cacher.

Pour la toxicité, nous connaissons bien la chronologie d'apparition des signes cliniques. Nous réalisons un suivi attentif quotidien voire plus fréquent ce qui nous permet de les suivre et le cas échéant de mettre à mort un rongeur qui serait très atteint et dont on sait qu'il mourra spontanément si nous n'intervenons pas.

Le projet pourrait utiliser un nombre total de 500 rats et 500 souris sur 5 ans : ce nombre est calculé sur une prévision de 10 études par an, soit 10 appâts mis sur le marché. Il peut être inférieur, en fonction de la demande de nos commanditaires.

17505 L'émergence et la dissémination de la résistance aux antibiotiques représentent un problème de santé publique et animale majeur qui ne pourra pas être complètement résolu avec un meilleur usage et une réduction de l'utilisation des antimicrobiens. Cette utilisation raisonnée limite la pression de sélection exercée sur les populations bactériennes et l'émergence de nouvelles souches présentant des résistances aux antibiotiques mais pourrait n'avoir que relativement peu d'effet sur la dissémination des gènes de résistance de souches porteuses à d'autres souches de l'environnement. En effet, la dissémination de la résistance aux antibiotiques fait appel à des éléments génétiques mobiles dont le transfert peut être régulé par des agents antimicrobiens (antibiotiques) mais également par d'autres molécules (polluants aromatiques, pesticides, désinfectants, ...) qui agissent en concentrations dites sub-inhibitrices, provoquant uniquement l'arrêt de la croissance bactérienne. Il apparaît donc comme essentiel d'investiguer plus en détails l'importance de ces mécanismes de dissémination de résistances aux antibiotiques associés à des polluants environnementaux afin de pouvoir intégrer la réalité de ces phénomènes et envisager des mesures visant à les limiter.

Ce projet a ainsi pour objectif de démontrer, en reproduisant un écosystème aquatique intégrant des truites arc-en-ciel dans un milieu confiné, la capacité d'agents chimiques environnementaux (antibiotiques, pesticides, ...) à induire la diffusion d'un élément génétique mobile bactérien impliqué dans la dissémination de résistances aux antibiotiques. La diffusion de l'élément génétique mobile, introduit dans le système au travers de bactéries donneuses, sera suivi par des outils moléculaires dans les différents compartiments du système expérimental (eau, biofilms, poissons).

Le présent projet intègre un total de 4 procédures, les deux premières ayant pour objectif de mettre au point le système expérimental et les deux dernières de tester l'effet des inducteurs chimiques. Les poissons utilisés seront des truites arc-en-ciel (1 à 10 g), pour un total de 5370 individus.

Ces 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, à savoir, 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. Aucun dommage potentiel pour les animaux n'est attendu. Des tests *in vitro* ont démontré en amont le pouvoir de certaines molécules chimiques présentes dans l'environnement à induire la dissémination de l'agent génétique mobile. La nécessité de reproduire ce phénomène *in vivo* ne permet pas de remplacer l'utilisation de poissons.

17506 Les virus de la Septicémie Hémorragique Virale (vSHV) et de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (vNHI) sont responsables de maladies piscicoles sévères dans les élevages de salmonidés. L'Union Européenne a mis en place un système de surveillance vétérinaire pour ces maladies basées sur une classification de zones ou piscicultures en fonction de leurs statuts sanitaires (présence/absence du virus), et des sommes importantes sont investies chaque année pour assurer son fonctionnement. Ces virus sont retrouvés parmi la population de poissons marins sauvages. Les virus de type vSHV isolés de poissons marins sauvages ne produisent généralement pas ou peu de mortalité chez les truites arc-en-ciel d'élevages continentaux infectées par balnéation (mise en contact du virus et des poissons via l'eau des bassins d'élevage), et inversement. Des observations similaires ont été rapportées pour les virus de type vNHI. Cependant, à l'heure actuelle, aucune méthode conventionnelle de virologie ou sérologie ne permet de discerner les virus isolés de poissons marins des virus isolés de poissons d'eau douce. Le développement de nouveaux outils permettant la différenciation fine de ces souches virales virulentes ou non virulentes permettrait d'améliorer significativement la surveillance et la gestion des élevages piscicoles français, pour lesquels la truite arc en ciel est une espèce majeure, mais aussi européens.

Dans ce contexte, les objectifs de ce projet sont i) d'identifier des marqueurs génétiques de virulence pour le vSHV et le vNHI et ii) de développer une méthode rapide et fiable permettant de discriminer les isolats viraux en fonction de leur caractère pathogène, ce qui permettrait d'améliorer la gestion sanitaire des élevages.

Une seule procédure expérimentale sera menée sur des truites arc en ciel juvéniles élevées au sein de la structure d'expérimentation. Elle consistera à confirmer l'implication dans la virulence de zones du génome viral en infectant les poissons avec des souches virales recombinantes (souches dont le matériel génétique a été modifié) dans lesquelles ces zones auront été insérées.

Le critère de mortalité utilisé pour déterminer le niveau de virulence des souches recombinantes et répondre aux objectifs fixés ne permet pas de remplacer les animaux. La procédure expérimentale a néanmoins été élaborée afin de réduire au maximum leur nombre et de raffiner leur utilisation. 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. Le nombre d'alevins nécessaires sera au maximum de 9600. La réalisation des infections expérimentales pour les phases d'estimation de la virulence, à raison de 3 répétitions pour une souche testée (triplicat), répond aux exigences statistiques et intègre les problématiques de densité et de variabilité inter-bacs.

17507 Depuis plus de 10 ans, le cancer est la première cause de mortalité en France. L'étude des différentes tumeurs a permis de mettre en évidence une molécule surexprimée au niveau de celles-ci comme dans le cancer colorectal, le cancer ovarien ou encore le cancer cérébral. Mis à part dans le cadre du cancer colorectal où les dépistages permettent une prise en charge précoce dans le développement de la maladie, les patients atteints de cancer cérébral ou de cancer ovarien sont généralement diagnostiqués à un stade avancé de la maladie. Malgré les avancées dans les plans de traitement de ces différents cancers, il existe encore un besoin d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques permettant de prolonger la survie des patients. Dans l'optique du développement de telles molécules, les modèles expérimentaux chez la souris permettent d'étudier la réponse à de nouveaux traitements.

L'objectif de ce projet est d'évaluer chez la souris la biodistribution et la toxicité d'un candidat médicament qui a déjà fait état de fortes propriétés anti-tumorales *in vitro* et *in vivo* en laboratoire.

Le candidat médicament en question cible la molécule surexprimée au niveau des tumeurs, limitant ainsi les effets secondaires du traitement. La biodistribution du candidat médicament sera évaluée chez des souris saines, mais également chez des souris porteuses de tumeurs. Enfin, la toxicité aiguë et chronique du candidat médicament sera évaluée en monothérapie ou en combinaison avec d'autres molécules. La première étape de biodistribution permettra de déterminer la dose à utiliser ainsi que la récurrence du traitement à appliquer permettant une exposition optimale au candidat médicament. La biodistribution sera étudiée à la fois dans des souris saines, mais également dans des souris porteuses de tumeurs, afin de déterminer la capacité du candidat médicament à cibler l'environnement tumoral. Une fois la dose thérapeutique optimale validée, la toxicité du candidat médicament sera étudiée à cette dose ainsi qu'à des doses plus élevées après une ou plusieurs injections. Par souci de reproductibilité des souris âgées de 8 semaines seront utilisées. Chaque groupe sera composé de 5 mâles et 5 femelles afin de pouvoir obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'analyse de la signification sera réalisée en considérant un test statistique approprié. Le nombre maximal d'animaux considéré est de 320 souris, pour un projet d'une durée maximale de 5 ans.

Dans un souci de raffinement, nous veillerons à améliorer le bien-être des animaux utilisés (éléments placés dans la cage pour favoriser la motricité, etc...) et à diminuer les contraintes pouvant être appliquées. La biodistribution et la toxicité d'un candidat médicament ne peuvent être étudiées dans un autre modèle d'étude. De plus, l'étude a été pensée de manière à réduire tant que possible le nombre d'animaux utilisés.

Les effets attendus du produit sont une non-accumulation du candidat médicament dans les organes filtrants (reins, foie, poumons...) et la caractérisation de la voie d'élimination. De plus cette étude a pour but d'identifier les effets adverses et les organes cibles, ainsi que les doses maximales tolérées et d'optimiser les meilleures stratégies de combinaison. Un suivi des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) sera une indication pour la prise en charge des animaux pouvant éventuellement mener à leur euthanasie en

accord avec la structure en charge du bien être animal. Il en est de même pour tout gain ou perte important(e) de masse corporelle (15% de la masse des animaux).

Par ailleurs, ces étapes constituent un prérequis indispensable avant la future réalisation d'essais cliniques concernant ce candidat médicament.

17508 L'accumulation de cellules sénescents est actuellement considérée comme un processus pathologique majeur impliqué dans la physiopathologie de différentes pathologies respiratoires liées à l'âge et en particulier dans la BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO). Par définition, les cellules sénescents ne se divisent plus et perdent la capacité de réparation des défauts moléculaires suite à une agression (par exemple l'exposition à la fumée de cigarette) contribuant ainsi à un défaut de réparation tissulaire et à la surexpression de médiateurs impliqués dans plusieurs pathologies.

Limiter le processus de sénescence et par extension, le développement des maladies liées à l'âge représente actuellement un enjeu crucial.

La perte d'élasticité tissulaire et l'accumulation de cellules sénescents sont deux caractéristiques du vieillissement qui sont accélérés par divers stress comprenant, entre autres, l'exposition à la fumée de cigarette. La déstructuration des fibres d'élastine pulmonaires (perte d'élasticité et dysfonction alvéolaire) et la sénescence accrue des cellules pulmonaires sont deux processus clés de l'emphysème et de la BPCO.

Des résultats préliminaires obtenus démontrent un lien encore inexploré entre élastine et sénescence cellulaire.

Notre but est de comprendre les effets des anomalies des fibres d'élastine sur la sénescence cellulaire et le développement de l'emphysème pulmonaire, et inversement les effets de la sénescence cellulaire sur les fibres d'élastine.

Cette étude nécessite de travailler chez l'animal car aucun modèle *In vitro* ne permet de mimer la physiopathologie des patients BPCO et/ou atteints d'emphysème étant donné la complexité de ces pathologies. De plus, elle nécessite de travailler sur des modèles animaux transgéniques uniquement disponibles chez la souris, nous utiliserons des souris contrôles Elastine +/+ exprimant de manière normale l'élastine et des souris transgéniques Elastine +/- déficientes en élastine afin d'évaluer l'effet de la perte constitutive d'expression d'élastine dans différents modèles d'emphysème. Les souris déficientes en élastine vivent aussi longtemps que les souris contrôles et elles ne présentent pas de différences morphologiques (poids, pelage). Ces souris seront étudiées à différents âges afin d'évaluer le développement spontané d'emphysème pulmonaire.

Nous évaluerons les effets de l'élimination des cellules sénescents grâce à un sénolytique (qui élimine spécifiquement les cellules sénescents) sur ces souris contrôles et transgéniques dans différents modèles :

- 1) L'exposition à la fumée de cigarette qui est un puissant inducteur de sénescence cellulaire et de perte/dégradation de l'élastine ;
- 2) L'exposition des souris à l'hypoxie chronique induisant une hypertension artérielle pulmonaire retrouvées chez les patients BPCO et atteints d'emphysème.

Dans cette étude nous respectons la règle des 3R, nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux considéré comme absolument indispensables au déroulé de notre projet. En réduisant au minimum le nombre de souris tout en garantissant l'obtention de résultats robustes scientifiquement et statistiquement, nous utiliserons 352 souris.

Les animaux seront perpétuellement surveillés à la fois par les zootechniciens et par les investigateurs de ce projet. Ils seront en communication pour s'assurer du bien-être et de la santé des animaux.

Pour éviter toute souffrance animale, ils seront sous anesthésie générale et analgésie pendant toute la durée des manipulations invasives. De plus, une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée afin d'anticiper si nécessaire la mise à mort des animaux au cours des expérimentations. Nous enrichissons également les cages des animaux avec des maisons, des cotons fournis par l'animalerie.

17509 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 neurologie (ex : chirurgie d'hernie discale). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'en assurer sur des modèles animaux, les petits ruminants et les lagomorphes sont des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain. Les porcins et les rongeurs peuvent également être utilisés dans des cas particuliers et l'utilisation du modèle canin est 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). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 800 lapins, 500 ovins/caprins, 200 rats, 150 porcins et 150 chiens soit un total de 1800 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 + 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.

17510 La maladie de Stargardt est une pathologie de l'œil caractérisée par une dégénérescence progressive des cellules photosensibles de la partie centrale de la rétine et touche 1 personne sur 20000 à 30000. Cette maladie d'origine génétique, est causée par une mutation présente sur le gène ABCA4 du chromosome 1. Chez des personnes présentant une vision normale, ce gène est responsable de la synthèse de protéines nécessaires à l'élimination de déchets toxiques produits par les cellules de la

rétine. Par conséquence, l'atteinte du fonctionnement de ce gène favorise l'accumulation de ces déchets cellulaires au niveau de la rétine et provoque une dégénération progressive des cellules. Les patients perdent progressivement la vision centrale impactant de manière significative la lecture, la conduite, la reconnaissance faciale aussi bien même que la perception des couleurs. Malheureusement, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace pour cette maladie.

Les avancées considérables des dernières années en matière de thérapie génique permettent aujourd'hui de modifier le matériel génétique de certaines cellules pour guérir des maladies liées à l'atteinte de gènes. Plus précisément, les nouvelles approches d'édition du génome sont très prometteuses permettant de modifier précisément des parties spécifiques de gènes dont le fonctionnement est altéré par une ou plusieurs mutations néfastes pour l'organisme tout en gardant le reste de l'ADN intacte. Ces techniques permettent ainsi de corriger certaines mutations pouvant causer des pathologies sévères et apporter une lueur d'espoir pour le traitement de maladies génétiques aujourd'hui incurables.

Ce projet a ainsi pour objectif d'étudier chez le primate non-humain (PNH) un outil d'édition du génome administré dans les cellules spécifiques de la rétine. Cet outil sera administré à l'aide de vecteurs adénoviraux (AAVs) dans certaines cellules rétinienne et ne produira un effet que sur une partie très localisée de la rétine. L'objectif de ce projet est ainsi d'évaluer si cet éditeur du génome peut s'exprimer spécifiquement dans des cellules ciblées génétiquement (photorécepteurs et des pigments épithéliaux). Différents AAVs contenant les outils d'édition seront injectés en une seule injection dans plusieurs parties de l'œil sans altérer la vision de l'animal n'induisant par conséquence aucune nuisance pour les animaux. De plus, l'œil étant un organe fermé, il n'est espéré aucune transmission à d'autres organes. La sécurité et l'efficacité des AAVs est aujourd'hui reconnue pré-cliniquement et par des essais cliniques portés chez des patients aveugles comme étant une méthode sûre. A terme, le bénéfice de cette étude sera d'établir une preuve de concept solide scientifiquement permettant de pouvoir transposer directement cette technique comme outil thérapeutique fiable pour le démarrage d'essais cliniques chez l'Homme.

Règle des 3R : Remplacement : La maladie de Stargardt affecte les cellules photoréceptrices de la fovéa, partie centrale de la rétine. Dans cette étude, le remplacement par des modèles non animaux n'est pas possible. De plus, l'utilisation de modèles animaux "inférieurs" tels que les rongeurs ne sont pas possible car ils ne possèdent pas de fovéa, structures oculaires cible dans cette étude. Réduction : le nombre d'animaux utilisé pour ce projet a été réduit à son maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Huit macaques *Cynomolgus* seront ainsi utilisés sur 5 ans. Raffinement : pour chaque procédure réalisée, les interventions seront réalisées sous anesthésie générale complétée par des compléments analgésiques et anti-inflammatoires. L'ensemble des méthodes expérimentales ont été pensées et choisies pour éviter toute souffrance des animaux et les critères de points limites sont prévus pour réagir en cas d'effets indésirables. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux, dans des animaleries respectant les standards prévus par la réglementation et dans un environnement adapté et enrichi.

17511 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.

REMPACEMENT : 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 8 souris par sexe et par groupe sera utilisé selon les procédures afin de garantir la validité scientifique de l'étude. Un nombre maximum de 579 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.

17512 Dans la presque quasi-totalité du cerveau, les neurones qui sont présents ont été formés pendant le développement embryonnaire, ou immédiatement après la naissance, fixant le nombre de ces cellules pour la vie entière de l'individu. Mais la découverte d'une production continue, à l'âge adulte, de neurones dans une structure particulière du cerveau, le gyrus denté (GD) de l'hippocampe, a ouvert un nouveau chapitre dans la recherche des mécanismes cellulaires sous-tendant le fonctionnement du cerveau, en particulier pour ce qui concerne la mémoire à long-terme. Malgré des années de recherche intensive, la fonction de ces nouveaux neurones (appelés neurones granulaires) reste évasive. Nous avons préalablement démontré qu'il existe une relation réciproque avec la mémoire : les quantités de nouveaux neurones déterminent les capacités mnésiques, et en retour, l'apprentissage influence ces quantités. Récemment, l'équipe a montré (i) que les neurones nés dans le cerveau adulte (Adu) répondent à l'apprentissage, une propriété que ne partagent pas les neurones nés pendant le développement (Dev), et (ii) que les neurones Adu et Dev sont recrutés par des processus de mémoire différents, liés respectivement à la résolution de problèmes d'orientation spatiale ou à la reconnaissance de contexte.

Sur ces bases, le présent projet vise à déchiffrer les propriétés respectives des neurones granulaires Adu et Dev. Notre hypothèse est que la sensibilité des neurones granulaires à un stimulus donné dépend de l'âge qu'avait l'animal au moment où ils ont été générés. Afin de la tester, nous proposons d'utiliser une approche expérimentale permettant de visualiser la réactivité des neurones suite à des stimulations électriques délivrées dans le cerveau à des intensités variables. Les expériences seront réalisées chez le rat, une espèce qui sert de modèle de référence dans toutes les études déjà publiées dans ce domaine de recherche. Nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à 400 sur une durée de 4 ans. En effet, à l'heure actuelle, il n'est pas possible de Remplacer l'expérimentation animale par des approches alternatives dans ce domaine d'études, la complexité du système nerveux ne permettant pas sa reproduction *in vitro*. Le cerveau des mammifères est constitué par un grand nombre de noyaux interconnectés en réseaux, et regroupant plusieurs milliards de neurones différents distants les uns des autres. Or, notre étude nécessite la visualisation et l'intégrité des réseaux englobant différentes régions du cerveau, ce qui rend impossible l'utilisation de coupes de tissus ou de cultures de cellules. Par ailleurs, il n'est actuellement pas possible d'utiliser des modèles *in silico*, puisque le fonctionnement même de l'organe n'est précisément pas connu. En revanche, tous les efforts seront portés afin de Réduire le nombre d'animaux utilisés: la valeur indiquée ci-dessus correspond au minimum permettant un traitement statistique approprié. De même, une attention particulière sera portée aux méthodes de Raffinement de l'étude, afin de préserver au mieux le bien-être des animaux durant les procédures.

Ainsi, l'observation des animaux et de leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post-chirurgicales, sera effectuée quotidiennement. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, antidouleur) seront utilisés pour réduire la douleur associée aux opérations chirurgicales.

17513 Les lipides (ou graisses) alimentaires sont essentiellement composés d'acides gras et ces derniers sont une composante importante de notre corps, influençant la composition des membranes cellulaires. Il a été montré que les différents acides gras présentent diverses activités biologiques et impactent la santé à long terme de façon différente. Notamment, les acides gras non-saturés comme l'oléate, principal constituant des huiles comestibles comme l'huile d'olive ou le beurre de karité, permettent d'augmenter la longévité chez certains organismes. Au contraire, les acides gras saturés comme le palmitate, très présent dans l'huile de palme ainsi que dans toutes les graisses et huiles animales comme le beurre, et surtout les acides gras partiellement hydrogénés générés par l'industrie alimentaire, sont un sujet d'actualité du fait de leurs effets négatifs sur la santé, particulièrement à cause de leur toxicité.

Notre équipe a étudié et approfondi les différents effets biologiques des différents types d'acides gras au niveau cellulaire et moléculaire, dans le but de mieux comprendre l'origine des mécanismes qui impactent de façon positive ou négative la santé. De façon intéressante, nous avons pu constater que l'un des mécanismes différemment impactés par les différents acides gras est la sécrétion des protéines. En effet, nous avons montré que seuls certains acides gras (dont l'oléate) étaient capables de bloquer cette dernière, et que cet effet spécifique se révélait être potentiellement essentiel pour expliquer les mécanismes sous-jacents aux effets des divers acides gras sur notre état de santé général. Afin de valider les résultats prometteurs obtenus *in vitro* et éclaircir au niveau physiologique l'impact des acides gras, ce projet vise à étudier la sécrétion protéique *in vivo* grâce à la quantification des certaines protéines dans le sang et dans l'urine de la souris. Le but final est d'approfondir le mécanisme d'action précis de l'oléate, afin de mieux comprendre son potentiel bénéfique sur la longévité et la santé et afin de différencier ses effets bénins de ceux des autres classes d'acides gras.

Les procédures expérimentales conçues répondront aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Ce projet ayant pour objectif de déterminer les effets sur la sécrétion des protéines induite par les différents acides gras, nécessite un modèle mimant le plus fidèlement possible la circulation systémique, pour pouvoir étudier en détail le transport des protéines secrétées dans un être vivant entier. Comme il est actuellement impossible de reconstituer le système circulatoire *in vitro/ex vivo* du fait de sa complexité, il est absolument nécessaire d'avoir recours à un modèle animal. Pour ce projet, nous avons choisi le modèle souris, ce dernier étant suffisamment petit pour en utiliser un certain nombre, facile à manipuler, suffisamment grand pour recevoir des injections dans un système circulatoire proche de celui de l'homme et le plus utilisé en expérimentation animale. Nous allons injecter sous anesthésie à les souris de l'ADN dans la veine de la queue pour exprimer de la luciférase, une enzyme clé de la réaction de bioluminescence, au niveau du foie. Puis, elles recevront une injection intrapéritonéale avec les acides gras d'intérêt et enfin, l'injection intrapéritonéale de biotine permettra le relargage de la luciférase depuis le foie vers la circulation sanguine et jusqu'au système urinaire. La présence de la luciférase sera évaluée en quantifiant la luminescence dans le sang et dans l'urine. Notre hypothèse de travail, basée sur les résultats obtenus *in vitro*, est que l'oléate agit d'une façon ciblée sur certains types de cellules en bloquant la sécrétion protéique. Si cette hypothèse est vérifiée, nous injecteront les acides gras à les souris pour évaluer la sécrétion des cytokines aussi, afin de pouvoir approfondir l'impact des acides gras sur l'inflammation et sur différents types de cellules ciblées.

Ce projet, d'une durée pouvant aller jusqu'à 2 ans, impliquera l'utilisation de 406 souris, soit le nombre maximal que nous prévoyons d'utiliser.

L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales ne concordent pas avec notre hypothèse de travail, réduisant ainsi l'utilisation de souris. Afin de tirer le meilleur parti de ces animaux, plusieurs échantillons seront collectés pour extraire le maximum de données de chaque expérience et seront partagés avec nos collaborateurs afin de réduire l'utilisation future d'animaux. Pendant toutes les expériences, les animaux seront logés dans le respect de leur bien-être (maximum 5 souris par cage, présence de coton

et/ou d'abris en papier pour améliorer l'environnement). Tous les animaux seront acclimatés au moins une semaine avant le début de l'expérience. Toutes les personnes impliquées dans ce projet sont techniquement qualifiées et formées en continu aux pratiques en expérimentation animale. Une veille scientifique continue sera menée pour exclure toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

17514 La mucopolysaccharidose de type IIIB (MPSIIIB), ou maladie de Sanfilippo B, est une maladie rare de surcharge lysosomale, transmise selon le mode autosomique récessif et qui affecte 0.7 à 1.8 nouveaux nés pour 100000 naissances en Europe. Elle est causée par le déficit d'une enzyme lysosomale, l' α -N acétylglucosaminidase (NaGlu), requise dans la voie de dégradation de l'héparane sulfate. Ce déficit enzymatique engendre une accumulation toxique de l'héparane sulfate dans de nombreux organes dont le foie, la rate et surtout le cerveau. La maladie de Sanfilippo B est caractérisée par une atteinte sévère du Système Nerveux Central (SNC). La maladie débute le plus souvent entre 2 et 6 ans avec un retard du développement psychomoteur, des troubles du comportement, un défaut d'attention, une hyperactivité et une agressivité. La régression des acquisitions intellectuelles est rapide et sévère et dans la phase finale, ils deviennent grabataires, perdent tout contact avec leur entourage et développent une encéphalopathie profonde. Le décès survient généralement au décours d'une surinfection respiratoire. L'espérance de vie des enfants atteints de cette pathologie est de l'ordre de 15 à 20 ans. Actuellement, aucun traitement approuvé ne peut aboutir à la guérison. Les seuls soins apportés visent à traiter les complications liées à la maladie et améliorer la qualité de vie des malades et de leur entourage. Différentes stratégies thérapeutiques ont été testées, telles que la greffe de moelle osseuse ou encore la production d'enzyme recombinante mais leur impact sur l'évolution neurologique est faible. La thérapie génique semble être encourageante pour traiter cette pathologie. Nous avons déjà mené un essai clinique par thérapie génique par thérapie génique intracérébrale chez 4 enfants. Les résultats sont très encourageants chez les patients les plus jeunes. Le traitement est bien toléré et indique un bénéfice dans le développement neurocognitif. Cependant, il est important d'augmenter la quantité d'enzyme apportée et de mieux cibler l'ensemble du cerveau. Pour cela, nous proposons de changer de vecteur et d'utiliser un sérotype d'AAV passant la barrière hématoencéphalique. L'objectif de cette étude est de réaliser la partie translationnelle du projet avec l'étude de faisabilité et de tolérance chez le primate non humain.

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). Le nombre total d'animaux utilisé dans ce projet sera de 12 primates non humains.

Remplacement : 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).

Réduction : 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 12 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.

Raffinement : 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. 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. Des examens cliniques journaliers et l'application de critères d'arrêt de protocole permettront de veiller au bien-être des animaux.

17515 Le but du projet de notre équipe est d'analyser les bases cellulaires de l'hyperémie fonctionnelle, c'est à dire le lien entre l'activation cérébrale et l'augmentation réflexe du flux sanguin, lien qui est à la source de l'imagerie fonctionnelle cérébrale de type fIRM chez l'homme. Notre but est donc de caractériser l'ensemble des types de cellules cérébrales (tels que les neurones ou les cellules gliales) participant à la régulation de ce phénomène. Plus précisément, nous projetons d'étudier, dans le bulbe olfactif et le cortex du rongeur anesthésié, sédaté ou éveillé, les réponses calciques cellulaires et vasculaires à la présentation d'odeur, à la photoactivation, à des stimuli d'hypercapnie ou des stimulations des moustaches. Nous poursuivrons cette étude dans des modèles pathologiques.

Sur le plan technique, nous observerons ces réponses en utilisant la microscopie bi-photonique, l'imagerie ultrarapide ultrasonore (ultrafast ultrasounds) et l'électrophysiologie. Ces expériences seront effectuées après craniotomie et pose d'une fenêtre d'observation en verre, en plastique transparent ou en silicone. Nous vérifierons si les résultats obtenus restent valables au niveau du néocortex.

Tout au long de notre projet, nous nous engageons à toujours nous reporter à la "règle des 3 R":

- Remplacer les modèles animaux autant que possible en développant les analyses statistiques basées sur des observations pairées (paired t-test ou paired Wilcoxon signed rank test) et les modèles mathématiques.
- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation, en travaillant sur des animaux chroniques, associés à plusieurs procédures.
- Raffiner la méthodologie utilisée en améliorant les conditions expérimentales et en introduisant des points limites à chaque étape de nos procédures.

Il n'existe pas de méthode alternative possible. L'étude du couplage neurovasculaire impose l'utilisation de certains mammifères. Seule la souris est une espèce chez laquelle il est aisé de générer des animaux transgéniques, le rat est un des rares modèles de pathologie du système glymphatique dans lequel l'hyperémie est altérée. Durant toute la durée du projet, et particulièrement lors des actes de chirurgie, nous prenons soin d'éviter un maximum la souffrance des animaux. Nous utilisons des anesthésiques et des analgésiques dès que cela est nécessaire et nous surveillons quotidiennement le bien-être et la santé des animaux. Tout signe de souffrance entraînera l'euthanasie de l'animal.

Afin d'analyser le rôle des principaux types de cellules du cerveau participant à l'hyperémie fonctionnelle, 12 modèles de souris transgéniques seront utilisés par an, à raison de 32 souris par modèle et deux lignées de souris contrôles soit 426 souris chaque année et 2130 souris pour les 5ans. Nous utiliserons également deux modèles de rats, à raison de 15 rats par an, soit 75 rats pour les 5 ans.

L'observation de l'activité cérébrale sera menée - soit de manière aigüe immédiatement après la craniotomie - soit dans un second temps, une semaine après la pose d'une fenêtre d'observation chronique, avec des animaux anesthésiés, sédaté ou éveillé et entraînés.

A long terme, ce projet permettra

- 1) de comprendre les mécanismes physiologiques régulant le flux sanguin cérébral,
- 2) de comprendre la nature et les limites des signaux utilisés en imagerie fonctionnelle de type IRM chez l'homme,
- 3) de déterminer les bases physiopathologiques de pathologies telles que l'ischémie et les maladies des petits vaisseaux, qui rentrent en jeu dans tous les types de maladies neuro-vasculaires et ainsi améliorer les futurs traitements.

Ces résultats contribueront à mieux comprendre les limites de l'imagerie humaine.

17516 La cécité nocturne congénitale stationnaire (CNCS) est un groupe de pathologies rétiniennes cliniquement et génétiquement hétérogène. La plupart des personnes atteintes ont une acuité visuelle basse, associée à des difficultés d'orientation en condition de faible luminosité. De nombreux patients présentent également d'autres anomalies oculaires telles qu'un strabisme, un nystagmus ou une forte myopie (< -6 dioptries). Si plusieurs modèles *in vivo* de CNCS existent, peu d'études font cas d'une mesure précise de la myopie au sein desdits modèles. Ce projet a pour objectif d'évaluer de manière fiable la myopie dans les différents modèles *in vivo* de CNCS.

Il y aura sur ce projet 170 souris

Ce projet respectera la règle des 3R, 1) Remplacement : Etant donné qu'il n'est pas possible de reproduire un modèle de cécité nocturne *in vitro*, nos études nécessitent l'utilisation d'un modèle animal. 2) Réduction : le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet. 3) Raffinement : Les animaux seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié de l'animalerie. Les animaux seront hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les animaux bénéficieront si besoin d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse). 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.

17517 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 chimio/radiothérapie. Ces traitements sont de plus en plus souvent associés avec 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. Des études épidémiologiques ont analysé un lien potentiel entre les infections respiratoires, l'inflammation chronique et le cancer du poumon. Dans plusieurs modèles de tumeurs, il a été montré que les récepteurs de la famille Toll-Like (TLR) sont liés à l'inflammation. Certains TLR reconnaissent des acides nucléiques, notamment le TLR7, qui est un récepteur de l'ARN simple brin. La reconnaissance des virus par le TLR7 peut ainsi induire une forte inflammation pulmonaire. Parmi les virus respiratoires retrouvés en pathologie humaine, le virus respiratoire syncytial (RSV) sont fréquemment incriminés. Nous avons préalablement démontré que TLR7 est exprimé par les cellules tumorales pulmonaires dans des cohortes de patients ayant un cancer pulmonaire, et qu'une forte expression de TLR7 est de mauvais pronostic, et est corrélée avec une faible réponse à la chimiothérapie. Nous avons aussi montré que la stimulation de ce récepteur par un ligand synthétique a un effet pro-tumoral.

Sur la base de ces données, nous émettons l'hypothèse que les infections virales pulmonaires induisent une activation de TLR7, et par conséquent induisent un effet pro-tumoral et une résistance aux traitements anti-tumoraux. Nous suspectons ainsi que les infections virales peuvent avoir un impact sur le comportement de la tumeur (progression, métastases et réponse aux traitements) ainsi que sur la réponse immunitaire anti-tumorale (composition, activation et fonction des cellules immunitaires).

Le but de ce projet est mettre au point le modèle d'étude de la progression tumorale pulmonaire intrapulmonaire en réponse au virus respiratoire RSV, afin de pouvoir caractériser l'influence des infections virales sur la progression tumorale et l'infiltrat immunitaire.

Ce projet sera réalisé en utilisant des souris C57Bl/6 albinos. Le nombre total des souris utilisées sera de 270 animaux.

La règle des 3R sera appliquée :

Remplace (Remplacer) les modèles animaux : pour ces expériences, les modèles animaux ne peuvent pas être remplacés car nous étudions les effets d'un virus respiratoire sur la progression des tumeurs pulmonaires dans un organisme où le système immunitaire joue un rôle important.^{[1][2]}

Reduce (Réduire) le nombre d'animaux en expérimentation : les expériences seront regroupées pour limiter le nombre des animaux des groupes contrôles. Nous utiliserons des techniques d'imagerie non invasive pour le suivi de la progression tumorale.

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 euthanasier les animaux au cours des expériences, si des signes de souffrances sont visibles. Ceci ne peut donc pas être étudié *in vitro*. De plus, Les animaux auront un temps d'acclimatation de 8 jours avant d'être expérimentés. Les animaux seront observés de façon quotidienne et seront gardés en groupes de 5 et hébergés dans des cages appropriées offrant suffisamment d'espace vital. Un milieu enrichi adapté est prévu pour l'hébergement des souris.

17518 La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie rare qui atteint 1 garçon sur 3500. Il n'y a aucun traitement curatif et l'espérance de vie des patients atteint est de 25-30 ans. Elle est due à l'absence d'une protéine: la dystrophine. Ceci conduit à une augmentation du calcium intracellulaire puis à la nécrose des muscles. Nous avons donc ciblé une enzyme impliquée dans la régulation du calcium, afin de réduire cette augmentation.

Les résultats de sa délétion génétique ou de son inhibition pharmacologique chez la souris mdx, modèle d'une dystrophie légère, ont montré des effets protecteurs.

Nous allons réaliser *in vivo* une étude pharmacologique complète visant cette enzyme chez la souris DKO mdx-utrophine, modèle d'une dystrophie sévère, proche du phénotype observé chez les patients, dans le but d'ouvrir ainsi la voie à une nouvelle piste thérapeutique.

La souris mdx et a fortiori la souris dKO dystrophine-utrophine présente une faiblesse musculaire facilement évaluable par des méthodes non-invasives, et réversibles après traitement pharmacologique.

Tous les animaux sont concernés par toutes les procédures: injection de sérum physiologique ou d'un inhibiteur du signal calcique (3 fois par semaine pendant 4 semaines); suivi dès le lendemain par une évaluation fonctionnelle non invasive. En cas d'absence d'un effet bénéfique les injections seront poursuivies 15 jours et les évaluations fonctionnelles seront réalisées à nouveau.

Le nombre d'animaux utilisés dans le projet est de 40 (30 souris dko et 10 souris C57BL/6J). Ce nombre est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables sur la base d'arguments statistiques. La règle des 3R a été prise en compte. Dans cette étude un modèle animal est utilisé car il ne peut être remplacé par une étude sur une lignée cellulaire. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour sur le phénotype dystrophique mdx. Ainsi, 40 animaux ont été choisis dans chaque groupe de manière à obtenir une puissance suffisante afin de garantir la validité statistique des résultats de l'étude. Les procédures expérimentales ont été conçues dans le respect de la souffrance psychique et physique des souris. Les méthodes sélectionnées pour cette étude sont les moins invasives et les moins douloureuses actuellement. Les souris seront conservées au plus 6 semaines. Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement hebdomadaire, une gestion pour un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum). Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton. Enfin, si nécessaire, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage.

17519 Dans le contexte des pathologies cérébrales, comme la maladie d'Alzheimer (MA), les lésions neuropathologiques apparaissent de façon précoce vis à vis des premiers signes cliniques détectés. Jusqu'à aujourd'hui la détection de ces lésions cérébrales n'est pas possible *in vivo*, ce qui implique une prise en charge tardive des patients atteints de la maladie. Une des pistes d'amélioration de la prise en charge de ces patients consiste à développer des outils sensibles aux changements moléculaires et cellulaires à l'origine des signes cliniques. Dans le cadre de ce projet, nous allons investiguer deux outils susceptibles de détecter *in vivo* des modifications à l'échelle moléculaire et cellulaire par imagerie par résonance magnétique (IRM).

En particulier, la spectroscopie par résonance magnétique (SRMN) permet d'établir le profil métabolique d'un échantillon biologique comme le système nerveux central que ce soit dans des conditions normales ou pathologiques. Cependant, en raison de l'infime concentration des métabolites présents dans le tissu cérébral, cette technique est limitée par sa sensibilité de détection. De part l'utilisation des hauts champs magnétiques et l'implantation de dispositifs intra-cérébraux, la sensibilité de la SRMN est améliorée. Ainsi en combinant ces deux mesures, il est théoriquement possible de détecter et de quantifier des changements subtils de la concentration des métabolites en lien avec un vieillissement normal du cerveau, l'apparition ou de l'évolution d'une pathologie cérébrale chez différents modèles animaux, notamment rongeurs. Cette étude est menée dans le but d'investiguer la biocompatibilité d'un tel dispositif implantable chez des souris saines, afin de permettre à l'avenir

l'utilisation de ce dispositif susceptible d'améliorer la connaissance des pathologies cérébrales chez différents modèles de souris.

Dans le cadre de ce même projet, l'intérêt d'un deuxième outil (en parallèle des antennes implantables) sera étudié dans le cas particulier de la MA. La MA est principalement caractérisée par deux types de lésions cérébrales causées par l'accumulation anormale de protéines : la protéine A β et la protéine Tau. A ce jour, il n'existe pas de technique *in vivo* pour détecter à l'échelle individuelle et de manière non ionisante la présence de l'accumulation de ces protéines, en particulier de la protéine Tau. L'IRM est une modalité d'imagerie non ionisante qui présente une résolution spatiale meilleure que l'imagerie TEP. Nous pouvons alors envisager d'accéder par IRM à l'étendu topographique de ces lésions à l'échelle globale du cerveau et de façon plus précise. C'est pourquoi, des anticorps ciblant la protéine Tau ont été couplés à un agent de contraste classiquement utilisé en IRM (le gadolinium) pour permettre la détection *in vivo* de ces lésions. Ces anticorps anti-Tau couplés au gadolinium seront testés chez un modèle de souris génétiquement modifié pour reproduire les accumulations de la protéine Tau afin de déterminer leur sensibilité et spécificité.

Au total, 52 souris seront utilisées pour ce projet. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place de l'ensemble du projet et sera mise en application sur le terrain : 1) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de mécanismes cellulaires et moléculaires complexes à l'échelle globale du cerveau, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude ; 2) réduction, le nombre d'animaux utilisé est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données reproductibles et statistiquement solides ; 3) raffinement, instauré de sorte à améliorer le bien-être des animaux et diminuer au maximum le stress, la fatigue, la douleur. Les procédures tiennent compte du temps de récupération des animaux et leurs paramètres vitaux sont contrôlés tout au long des procédures. Pour chaque procédure chirurgicale, une analgésie et anesthésie appropriées sont mises en place. Le réveil des animaux est surveillé et une dose d'antalgique est administrée aux animaux afin de réduire la douleur post-opératoire. Un suivi particulier de chaque souris opérée est prolongé pour surveiller l'apparition de critère d'arrêt anticipé de la procédure.

17520 Le sepsis est l'une des principales causes de décès chez les patients de moins de 40 ans. Cette infection généralisée s'accompagne d'une extinction des capacités de réaction du système immunitaire aussi appelée immunosuppression (IS). Cette IS prépare le terrain au développement d'infections bactériennes secondaires nosocomiales. La gestion de ces infections à l'hôpital conduit à une utilisation massive d'antibiotiques générant un surcoût pour la collectivité et favorisant l'émergence de souches multi-résistantes. Ainsi le sepsis engage un système complexe de défense de l'organisme, devant être adéquate, spécifique et transitoire, de façon à éviter une activation aberrante du système immunitaire. Les lymphocytes T régulateur (Treg) remplissent cette fonction de contrôle du système immunitaire. Au cours de l'IS post-septique, il est observé une diminution de l'intensité des réponses immunes associée à une augmentation de l'activation des Treg.

Le but de notre étude est de mieux comprendre le rôle des lymphocytes Treg dans ce phénomène d'immunosuppression induit par le sepsis et si cette plus forte activation des Treg est due au TNF.

Le TNF alpha est connu comme étant une cytokine produite par l'organisme au cours du sepsis et activant les systèmes de défense de l'organisme. Dernièrement, il a été montré que cette molécule pouvait moduler l'activité des lymphocytes Treg et ainsi jouer un rôle clé au cours de l'apparition tardive du phénomène d'IS. Le TNF joue un rôle central dans l'activation du système immunitaire inné et adaptatif via son récepteur ubiquitaire TNFR1. Il semble aussi responsable lors des phases plus tardives de l'activation et de l'expansion des lymphocytes Treg via son récepteur à leur surface le TNFR2.

Nous avons développé un nouveau modèle d'immunodépression systémique post septique (sepsis à *S. aureus*) chez la souris. Dans ce modèle, les Treg activés par le sepsis expriment fortement le TNFR2+, un phénomène qu'on retrouve également chez l'homme. De plus, nous montrons que l'injection d'un anticorps neutralisant le TNFR2 permet de limiter cette expansion des Treg et l'immunosuppression post-sepsis. Il en est de même si l'on effectue cette expérience chez des souris déficientes pour le TNFR2. L'étude des mécanismes d'activation des Treg TNFR2+ au cours du sepsis semble

donc une voie de recherche à poursuivre avec comme objectif la découverte de thérapeutiques innovantes (anticorps anti TNFR2) dans la problématique de la maîtrise du risque infectieux nosocomial, en complément des thérapeutiques anti- infectieuses.

Dans ce projet, nous allons chercher à déterminer si l'activation des Treg par le TNF au cours du sepsis est dû à une action directe de la cytokine sur les cellules. Pour ce faire, nous avons développé au laboratoire des souris génétiquement modifiées dans lesquelles l'expression de TNFR2 est éliminée dans les seuls Treg par la technique des souris dites Cre-lox ou KO conditionnelles, c'est-à-dire des souris chez lesquelles il est possible de provoquer une extinction de l'expression du récepteur TNFR2 chez la population des Treg de manière transitoire. Grâce à ce travail, nous espérons avoir une meilleure connaissance de la physiopathologie du sepsis et de l'immuno-suppression associée. Nous espérons également pouvoir proposer de nouvelles approches thérapeutiques dans cette pathologie consistant à limiter l'activation des Treg.

Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Afin de remplacer les études sur cellules primaires, nous utilisons des lignées cellulaires transformées et de l'expérimentation *in vitro* pour analyser le phénotypique et les fonctions des cellules immunitaires impliquées dans la réponse au sepsis. L'évaluation et la comparaison de l'effet immunosuppresseur du sepsis et le rôle correctif d'une biothérapie ciblée contre le TNFR2 ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*). Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Les groupes d'études sont faits le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupes témoins. Et enfin nous cherchons à raffiner au maximum nos protocoles pour limiter la souffrance animale ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découler. C'est pourquoi nous planifions les expériences et le milieu sera enrichi pour éviter le stress des souris, nous effectuerons une surveillance quotidienne des animaux. Afin de limiter la souffrance nous procéderons à des procédures d'anesthésie pour les procédures expérimentales 2, 3 et 4. De par le sepsis, une perte de poids transitoire (< 5 jours) et modérée (< 20%) par amyotrophie est observé, sans perte de motricité. Ils ne constituent donc pas un paramètre pouvant être défini comme un point limite et mettre fin au protocole. Cependant tout autre signe de souffrance sera considéré comme un point limite entraînant la fin du protocole pour l'animale et son euthanasie.

Considérant l'ensemble de ces procédures appliquées sur la diversité des protocoles expérimentaux, nous estimons une utilisation à hauteur de 864 souris pour l'ensemble de ce programme de recherche qui va se dérouler sur les 5 prochaines années.

17521 L'insuffisance rénale chronique est une maladie associée à une morbi-mortalité importante, notamment liée à un sur-risque de pathologies cardio-vasculaires. Dans la maladie rénale chronique, il existe une minéralisation vasculaire spécifique, induisant des complications généralisées sévères (cardiaques, cérébrales, digestives). Nous avons préalablement étudié dans un modèle animal induisant des calcifications l'impact de facteurs extérieurs (calcium +/- vitamine D) sur le développement des calcifications au sein du parenchyme rénal avec la formation de plaques de calcifications rénales nommées plaques de Randall, et au niveau vasculaire.

Dans ce modèle, les animaux sont déficients en pyrophosphate, un inhibiteur puissant de la biominéralisation. Nous poursuivons les travaux montrant un bénéfice potentiel de la supplémentation en pyrophosphate sur la survenue de calcifications dans ce modèle, dans le cadre de l'induction d'une insuffisance rénale chronique modérée.

De plus, de récents travaux suggèrent qu'une autre thérapeutique joue un rôle dans ces phénomènes de calcifications, en inhibant les premières étapes de formation minérale. Nous évaluerons également l'influence des apports de ce traitement (minocycline) dans ce modèle, avec et sans insuffisance rénale chronique.

Il s'agit donc d'un modèle de calcifications rénales (plaque de Randall) et vasculaires, dans lequel nous accélérerons les lésions par le développement d'une insuffisance rénale chronique (IRC), lésions qui devraient être diminuées par la supplémentation en pyrophosphate, ou en minocycline.

Nous étudierons dans un premier temps, la dose nécessaire pour induire une insuffisance rénale à un mois, dans un groupe test de 20 souris de chaque sexe soit 40 souris.

Dans un deuxième temps, nous réaliserons une évaluation du degré de calcifications induites à un temps intermédiaire du protocole (3mois) en comparant 4 groupes de 8 souris (non mutées ou mutées avec ou sans IRC) et de chaque sexe soit 64 souris.

Puis, nous étudierons le bénéfice des thérapeutiques précédemment citées sur la survenue de calcifications plus développées (6 mois) en comparant 8 groupes de 8 souris (non mutées avec ou sans IRC et mutées avec ou sans IRC et avec ou sans pyrophosphate et minocycline) soit 128 souris.

L'ensemble de ces expérimentations seront réalisées en parallèle chez des femelles et des mâles puisque le phénotype est supposé différent, le développement des calcifications étant différents chez les mâles et les femelles Il y a aura donc un total de 232 animaux, étudiés à partir de l'âge de 2 mois pour des durées allant de 1 à 6 mois.

Notre modèle et nos procédures expérimentales sont optimisés selon la règle des 3Rs (réduire, remplacer, raffiner). En effet, le modèle vivo est indispensable en raison des multiples interactions qui existent entre les différents récepteurs et leurs ligands au niveau du tubule rénal. Le modèle *in vitro* n'est pas encore suffisamment complet pour permettre notre étude *in vitro*. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum à savoir 8 groupes de 12 animaux, 6 mâles et 6 femelles Dans le cadre du « raffinement », aucune intervention invasive n'est envisagée en dehors des injections. Une grille de suivi sera mise en place afin de suivre les animaux et leur état général au quotidien. Les animaux seront hébergés en portoirs ventilés ,une litière de cellulose enrichie avec des billes de cellulose que les animaux devront déployer pour y confectionner des nids ainsi que des bûchettes de bois de peuplier seront ajoutés à la litière pour que les animaux puissent ronger.

17522 Le contrôle et la stabilité du statut sanitaire des animaux est un point extrêmement important pour l'expérimentation chez la souris. En effet, si dans une étude sur un lot expérimental de souris l'ensemble des animaux a le même statut sanitaire exempt d'organismes pathogènes, alors la variabilité inter individus sera réduite. De fait il sera possible de réduire le nombre d'animaux à utiliser pour répondre à une question scientifique pertinente. Ainsi, ce contrôle est une des clés indispensables à l'application de la règle de réduction.

Nous disposons dans l'animalerie de l'institut d'une zone d'hébergement au statut SOPF soit exempt d'organismes pathogènes spécifiques et d'organismes opportunistes. Avec un tel statut sanitaire très élevé il est intéressant pour la communauté des chercheurs de pouvoir élever et produire l'ensemble des lots expérimentaux dans ce secteur SOPF.

La majorité des animaux de l'animalerie est aujourd'hui élevée dans une zone d'expérimentation au statut sanitaire EOPS et nous proposons de les transférer en zone SOPF afin de permettre aux chercheurs de pouvoir appliquer de façon globale le principe de réduction de manière beaucoup plus optimale.

Le transfert d'animaux vers une telle zone SOPF depuis une zone de statut sanitaire moins élevée est possible dans une seule condition qui implique la technologie de transfert d'embryons. Brièvement, des œufs fécondés au stade une cellule correspondant à une lignée transgénique sont prélevés et réimplantés dans une nouvelle femelle de statut SOPF dans la zone SOPF.

Nous utiliserons sur 1 an un total de 280 souris maximum, soit 1400 animaux pour la durée du projet. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) remplacement, le transfert d'embryons de lignées de souris est une technique de pointe qui est impossible à réaliser *in vitro* ou sur une autre espèce; 2) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de transférer les lignées ; 3) raffinement, les procédures prennent en compte le bien-être des animaux : ajout de maisonnette et neslet pour la nidification et la réduction au maximum la douleur: controle des paramètres de l'anesthésie lors de la réimplantation et de l'analgésie pré-et post opératoire et sur plusieurs jours suite à l'opération.

17523 Le maintien de l'intégrité musculaire a été décrit depuis longtemps comme étant dépendant de l'innervation et de l'exercice. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie musculaire sont encore mal compris.

Parmi les différents signaux trophiques, l'activité contractile du muscle, la neurotransmission et les facteurs neurotrophiques sont des éléments essentiels qui régissent l'intégrité de la masse musculaire. Une altération de l'activité électrique provoque une modification de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie musculaire.

Le but de cette étude est donc de déterminer les mécanismes impliqués dans le contrôle de la masse musculaire après une altération de l'activité électrique et d'identifier la part de responsabilité « neurogénique » versus « myogénique ».

Notre précédente étude nous a permis de montrer que la sous-unité CaVb1E du récepteur aux dihydropyridines (protéine impliquée dans la contraction musculaire) et la protéine GDF5, jouaient un rôle très important dans le maintien de la masse musculaire.

Ce nouveau projet aura comme objectif de comprendre les rôles respectifs des protéines CaVb1E et GDF5 au cours du vieillissement, dans un muscle immobilisé, ou après l'endommagement d'un nerf ou au cours de la dégénérescence musculaire comme dans la myopathie de Duchenne.

Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées *in vitro* avec des lignées cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin. De même, les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité. Néanmoins, 5 animaux par groupe seront malgré tout nécessaires pour permettre une analyse statistique. Les protocoles seront rigoureusement élaborés et réfléchis en avance pour que l'expérience soit interprétable et que l'on n'est pas à la refaire.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 640 souris C57BL/6JRj jeunes ou âgées, *170 souris MSTN (-/-) * et 70 souris dystrophiques dans lesquelles nous étudierons l'impact d'une supplémentation en protéines CaVb1E et GDF5 sur la masse musculaire.

Pour limiter la souffrance et l'anxiété, les procédures telles que les injections en intramusculaire, l'immobilisation ou la dénervation seront réalisées sous anesthésie gazeuse (l'isoflurane 3% en induction et 1.5% en maintien). Pour les procédures pouvant générer de la douleur, les souris seront injectées en sous-cutanée avec 0.1 mg/Kg de buprenorphine (Vetergesic) à l'aide d'une seringue à insuline 30 minutes avant la procédure puis 24h, 36h et 48h après.

Au cours des différentes procédures, la température des souris est maintenue constante à l'aide d'une plate-forme chauffante.

Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, une gestion pour un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum). Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton. Enfin, si nécessaire, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage.

17524 Les canaux ioniques sont responsables de la genèse et de la propagation de l'influx électrique dans le myocarde. Ces canaux ioniques sont présents dans la membrane des cellules cardiaques et interagissent avec des protéines partenaires essentielles à leur régulation. Parmi ces partenaires, nous étudions les protéines MAGUKs qui jouent un rôle clé dans la régulation de différents courants ioniques. Au cours des pathologies cardiaques, comme l'infarctus du myocarde, la fonction des canaux ioniques est altérée. L'objectif de notre recherche est de déterminer le rôle des MAGUKs, et en particulier la protéine CASK, dans les troubles du rythme associés au remodelage physiopathologique du cœur.

- Etude 1. Conséquences fonctionnelles de l'inactivation de protéines MAGUKs chez le rat et la souris. Un mauvais adressage ou une perte de l'interaction des canaux ioniques avec les protéines MAGUKs conduisent à des altérations de l'excitabilité cellulaire et par conséquent à des troubles du rythme. Notre objectif est d'étudier les effets de l'inactivation *in vivo* de CASK sur l'activité cardiaque *in vivo* par

échographie et électrocardiographie. Le niveau d'expression de CASK étant lié au développement, deux stades d'invalidation seront étudiés : invalidation de CASK chez le nouveau-nés et l'animaux adultes.

- Etude 2. Conséquence fonctionnelle de l'invalidation de CASK dans le remodelage myocardique chez le rat. Le modèle d'infarctus du myocarde (IDM) est l'archétype d'un remodelage myocardique complexe caractérisé par une zone ischémique cicatricielle et une zone distante remodelée. L'objectif est de déterminer le rôle de CASK dans le remodelage de la zone distante et sur la fonction cardiaque. Les rats contrôles et IDM seront invalidés pour CASK au moment de la chirurgie et une analyse fonctionnelle sera réalisée par échocardiographie et ECG de surface à différents stades.

- Etude 3. Etude de la surexpression de formes tronquées de protéines MAGUKs sur les propriétés fonctionnelles des cardiomyocytes *in vitro*. L'objectif de cette étude est de caractériser les domaines fonctionnels de la protéine CASK sur les courants ioniques. Une approche d'injection intracardiaque *in vivo* sous monitoring échographique sera utilisée pour délivrer les différentes constructions de CASK afin d'étudier 3 jours plus tard les courants ioniques et la localisation des canaux.

- Etude 4. Etudes fonctionnelles *in vitro*: Après le phénotypage cardiaque les rats et souris utilisés dans les études 1 et 2 seront utilisés pour des expériences *in vitro* : enregistrement des courants ioniques, enregistrement des potentiels d'action cellulaires, mesures immunohistochimiques.

Nous utiliserons au maximum 340 rats Wistar et 78 souris C57BL/6 en 5 ans. Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

Pour les études 1 et 2, les volumes injectés seront établis en accord avec le volume sanguin de l'animal afin d'injecter les plus petits volumes possibles. Si les résultats atteignent la significativité avec des expériences réalisées en duplicat, le nombre d'animaux sera réduit d'1/3 pour chaque étude. Pour l'étude 3 (infarctus du myocarde), bien que les traitements testés ciblent la fonction ventriculaire, nous prélèverons les oreillettes et les ventricules ainsi que d'autres organes des animaux non traités contrôles et malades et des animaux traités pour extraire les ARN messagers (ARNm) et les protéines. Nous pourrons ainsi constituer une banque pour des analyses omiques postérieures qui permettront une caractérisation de nos modèles de dilatation ventriculaire et auriculaire et qui pourra être utilisée par d'autres équipes pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter l'insuffisance cardiaque. Pour l'étude 4, seule la paroi ventriculaire ayant reçu l'injection de virus sera utilisée pour les études omiques (ANRm, protéines). Les cellules infectées seront identifiables grâce à un rapporteur fluorescent ; les cellules non infectées serviront de contrôle pour des expériences d'électrophysiologie pour d'autres utilisateurs de l'équipe travaillant sur de projets différents. Les volumes seront adaptés au poids de l'animal ; les virus seront injectés en utilisant un bras micromanipulateur pour réduire la durée de l'intervention.

Les animaux seront stabulés en groupe (1 portée/cage pour les animaux nouveau-nés, 2 rats/cage et 6 souris/cage pour les adultes) en portoirs ventilés avec : enrichissement de la sciure avec de la ouate, enrichissement de l'environnement structurel et social favorisé par des activités physiques et cognitives (des jeux cartonnés), accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. La température et l'hygrométrie sont contrôlées et monitorées. Le cycle d'éclairage est de 12h par jour (6h-18h). Une surveillance quotidienne sera effectuée par les zootechniciens et hebdomadaire par le porteur de projet pendant laquelle un tableau de score permettra d'évaluer les points limites : lésion cutanée, incapacité à se déplacer, toilettage et posture de l'animal. De manière globale, le comportement et l'aspect physique et expression faciale seront analysés. Dans le cas où un de ces points limites serait atteint, des procédures d'euthanasie appropriées afin de réduire la souffrance seront mises en place.